TOTALSYNTHESE EINES ACTINOMYCIN-ANALOGEN MIT HOMODETEN PENTAPEPTIDRINGEN UND EINES GRAMICIDIN S-ÄHNLICHEN CYCLODECAPEPTIDS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Götz Schwoerer
aus Göttingen

Göttingen 1973

TOTALSYNTHESE EINES ACTINOMYCIN-ANALOGEN MIT HOMODETEN PENTAPEPTIDRINGEN UND EINES GRAMICIDIN S-ÄHNLICHEN CYCLODECAPEPTIDS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Götz Schwoerer
aus Göttingen

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. Dr. e.h. H. Brockmann

Korreferent: Professor Dr. W. Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1973

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von April 1968 bis Dezember 1972 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. e.h. H. Brockmann durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Dr. e.h. H. Brockmann,
danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0012

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
II.	Zur Synthese von Actinomycinen und Cyclopeptiden	10
	1. Actinomycine	10
	2. Cyclopeptide	12
III.	Synthese des Actinomycins-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33)	13
	1. Vorbemerkungen	13
	2. Synthese von cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (5)	19
	3. Synthese des Actinomycins-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33)	
IV.	Synthese des Cyclodecapeptids cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (50)	27
	1. Vorbemerkungen	27
	2. Verlauf der Synthese	31
V.	Untersuchung des Cyclodecapeptid-dihydrochlorids 50 auf antibiotische Wirksamkeit und Vergleich mit Gramicidin S (6)	34
VI.	Untersuchungen zur Cyclodimerisierung und Polymerisation bei der Cyclisierung des Pentapeptids 28	38

Seite

1. Cyclodimerisierung 38

2. Lineare Polymere 40

VII. Synthese von Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) und Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62) 44

1. Vorbemerkungen 44

2. Synthese des Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) 46

3. Synthese von Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62) 48

4. Eigenschaften der isomeren Actinocinyl-bis-L-lysine 58 und 62 49

VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse 51

IX. Beschreibung der Versuche 53

X. Literaturverzeichnis 92

I. Einleitung und Aufgabenstellung

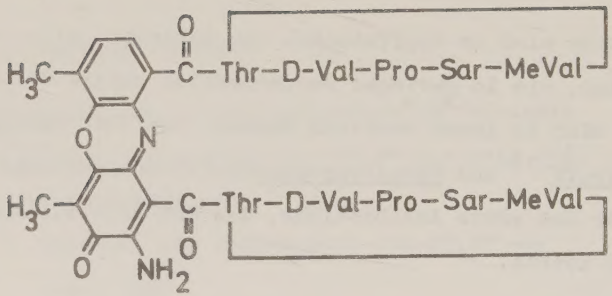
Antibiotika sind im Stoffwechsel von lebenden Zellen erzeugte Substanzen, die in geringer Konzentration andere Organismen abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen. Das 1940 von Waksman und Woodruff [1] aus Streptomyceten-Kulturen isolierte Actinomycin war das erste Antibiotikum, das man kristallisiert erhalten konnte.

Da die Actinomycine zwar antibiotisch hochwirksam, andererseits aber auch für Säugetiere äußerst toxisch sind, fanden sie zunächst wenig Beachtung. Medizinisch und damit chemisch interessant wurden sie erst, als 1952 Hackmann [2] im Tierversuch ihre tumorhemmende Wirkung nachwies, Schulte [3] eine günstige Wirkung bei Lymphogranulomatose (Hodgkin'sche Krankheit) beobachtete, und bei bestimmten menschlichen Tumoren eine cytostatische Wirkung nachgewiesen wurde [4,5].

In der Folgezeit konnten Brockmann und Mitarbeiter [6] zunächst die Struktur von Actinomycin C_3 (1b) und danach von einer ganzen Reihe weiterer Actinomycine aufklären.

Man fand, daß die Actinomycine Chromopeptide sind. Sie enthalten einen Chromophor, der für ihre rote Farbe verantwortlich ist, und zwei Peptidlactonringe aus je fünf Aminosäuren, die mit dem Chromophor säureamidartig verknüpft sind.

Formel 1a zeigt den bekanntesten Vertreter der Actinomycine, Actinomycin C_1 (in der angelsächsischen Literatur als Actinomycin D bezeichnet).



1a

b: D-a-Ile statt D-Val

Die bisher bekannten rund 30 nativen Actinomycine enthalten bis auf eins [7] den gleichen Chromophor und unterscheiden sich nur in der Aminosäurezusammensetzung ihrer Peptidlactonringe.

Gezielte strukturelle Abwandlungen der Actinomycine waren innerhalb enger Grenzen durch Variation der Kulturbedingungen [8] und durch nachträgliche chemische Umsetzung eines nativen Actinomycins möglich [9-14]. Eine Reihe von sowohl im Chromophor [15-19] wie auch im Peptidteil [20-26] abgewandelten Actinomycinen wurde aber erst zugänglich, als Brockmann und Lackner auf mehreren Wegen [23,27-29] die Totalsynthese von Actinomycin C_1 (1a) und C_3 (1b) gelungen war.

Die antibiotische und cytostatische Wirksamkeit der Actinomycine führt man auf ihre Fähigkeit zurück, mit Desoxyribonucleinsäure (DNS) Komplexe [30] zu bilden, so die DNS-abhängige RNS-Synthese

und damit die Proteinbiosynthese zu hemmen.

Komplexbildung mit DNS zeigen zwar auch andere 2-Aminophenoxazon-(3)-Derivate wie Actinomin [15], ohne jedoch antibiotisch wirksam zu sein. Der Unterschied zwischen ihnen und den Actinomycinen besteht nach Müller [31,32] darin, daß bei ersteren Komplexbildung und -zerfall so schnell erfolgen, daß die m-RNS-Polymerase beim Entlanggleiten am DNS-Strang nicht gehindert wird. Sie unterbinden also die Proteinsynthese nicht und wirken infolgedessen auch nicht bakteriostatisch, cytostatisch oder toxisch. Dagegen entsteht und zerfällt der Actinomycin-DNS-Komplex wesentlich langsamer. Ist die Lebensdauer des Komplexes deutlich größer als die Zeit, welche die m-RNS-Polymerase braucht, um ein Nucleosid in die m-RNS einzubauen, so wird die Progression des Enzyms entlang der als Matrize fungierenden DNS-Kette verhindert und damit die RNS- und Proteinsynthese blockiert. Verantwortlich für die lange Lebensdauer der Actinomycin-DNS-Komplexe sind offensichtlich die Peptidlactonringe der Actinomycine. Sie lagern sich nach Müller [31,32] an die beiden Helixstränge unter Konformationsänderung an, die - durch kleine Ringgliederzahl, ringstabilisierende Wasserstoffbrücke und sperrige Alkylreste der Ringe erschwert - langsam ist, langsame Bildung und Dissoziation des Komplexes zur Folge hat und damit dessen lange Lebensdauer verständlich macht.

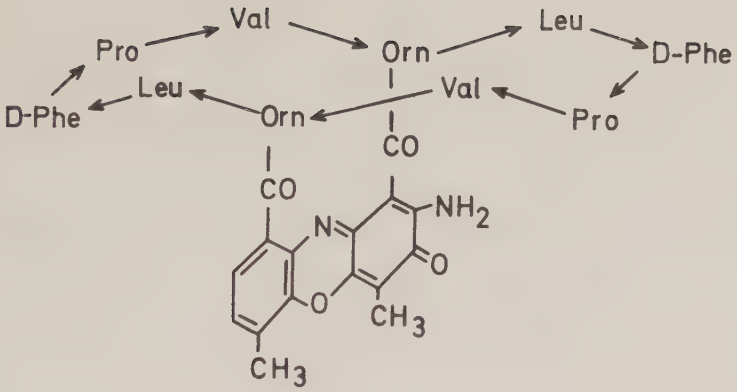
Die Frage, wie eng dieser kinetische Effekt an die spezifische Pentapeptid-Lacton-Struktur der nativen Actinomycine - die Unterschiede im Peptidteil sind bei diesen ja nur gering -

gebunden ist, läßt sich durch Totalsynthese entsprechend abgewandelter Actinomycine untersuchen.

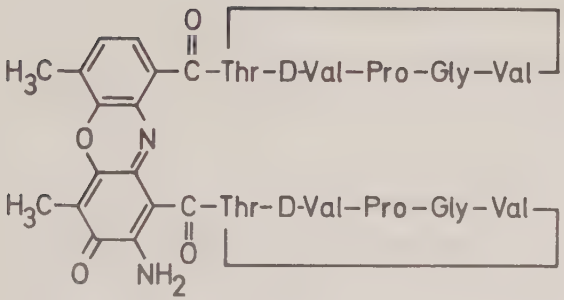
Das von Brockmann und Schramm [21,22] synthetisierte Actinomycin C_1-Enantiomere, bei dem sämtliche Aminosäuren in der spiegelbildlichen Konfiguration vorliegen, zeigte keine Komplexbildung mit DNS und keinerlei biologische Wirksamkeit. Nach dem von Müller [31,32] entwickelten Modell des Actinomycin-DNS-Komplexes können sich die Peptidlactonringe des Actinomycin C_1-Enantiomeren nicht an die Oberfläche der DNS anlagern, weil weder stabilisierende Wasserstoffbrücken zur DNS noch hydrophobe Wechselwirkungen sterisch möglich sind.

Auch die von anderen Arbeitsgruppen synthetisierten Actinomycin-Analogen mit relativ stark abgewandeltem Peptidteil verhalten sich ähnlich: Das von Mauger und Wade [20] synthetisierte Actinocyl-gramicidin S (2) - das einer früher diskutierten Actinomycinstruktur mit einem Cyclodecapeptid-dilacton anstelle zweier Pentapeptidlactonringe [33] ähnlich ist - zeigte ebenfalls keine Komplexbildung mit DNS, dementsprechend keine Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Synthese und eine stark verringerte Toxizität. Auch ein von Mosher und Goodman [26] dargestelltes Tetra-N-desmethyl-actinomycin C_1 (3), in dem Sarkosin und L-Methylvalin in beiden Pentapeptidlactonringen durch Glycin bzw. L-Valin ersetzt sind, zeigte keinerlei biologische Wirksamkeit.

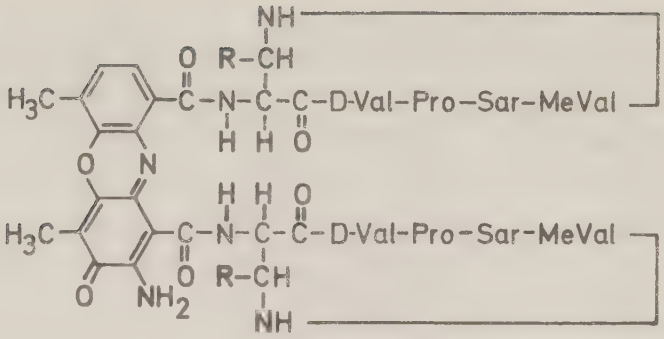
Im Gegensatz dazu haben die von Keienhofer und Mitarbeitern [24,25] synthetisierten Cyclopeptid-Actinomycine 4a und 4b, die sich vom Actinomycin C_1 (1a) nur durch den Austausch von L-Threonin


Val
Pro
Orn
Leu
D-Phe
D-Phe
Leu
Orn
Val
Pro
CO
CO
NH2
N
O
O
CH3
CH3

2


O
H3C
C-Thr-D-Val-Pro-Gly-Val
O
N
H3C
C-Thr-D-Val-Pro-Gly-Val
O
O
NH2

3



4a : R = H

b : R = CH_3

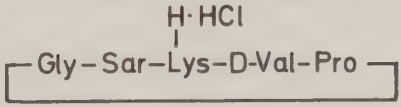
gegen L-α.ß-Diaminopropionsäure (4a) [24] bzw. L-threo-α.ß-Diaminobuttersäure (4b) [25] unterscheiden, eine mit Actinomycin C_1 vergleichbare biologische Wirksamkeit. Dieser Ersatz der Esterbindung durch eine Amidbindung scheint demnach die Konformation der Peptidringe nicht wesentlich zu verändern, so daß die Komplexbildung mit der DNS weder energetisch noch kinetisch beeinflußt wird.

Zur weiteren Untersuchung, welchen Einfluß der Peptidteil der Actinomycine auf die Komplexbildung mit DNS und die biologische Aktivität der Actinomycine hat, sollte nun ein Actinomycin synthetisiert werden, das sich in folgenden Punkten von den nativen Actinomycinen unterscheidet:

1. statt der Peptidlactonringe - also Cyclodepsipeptide [34] - homodete [34] Cyclopeptide

2. weniger hydrophobe Gruppen am Peptidteil
3. flexible Verknüpfung von Chromophor und Cyclopeptid über mehrere Methylengruppen.

Diese Punkte erfüllt das Actinomycin-Lys-D-Val-L-Pro-Gly-Sar, in dem das von Brockmann und Graef [35,36] dargestellte Cyclopentapeptid 5 über die ε-Aminogruppe des Lysins mit dem Chromophor verknüpft ist.



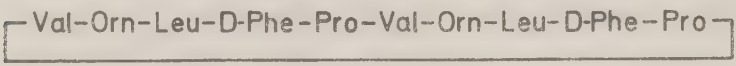
5

Ausgehend von einem Zwischenprodukt der Synthese des Cyclopentapeptids 5 ergibt sich gleichzeitig die Möglichkeit, eine Verbindung darzustellen, die einer anderen Klasse von Antibiotika analog ist, wie im folgenden erläutert wird.

Im Gegensatz zu den Actinomycinen, die als Chromopeptide an einem Chromophor zwei Depsipeptid-Ringe tragen, besteht eine große Gruppe von Antibiotika nur aus Aminosäuren. Davon sind die meisten homodete Cyclopeptide wie Gramicidin S [34], die Tyrocidine [34,37-39], Evolidin [34,40], Fungisporin [34], Mycobacillin [34,41], die Bacitracine [34,42] und Viomycin [43,44].

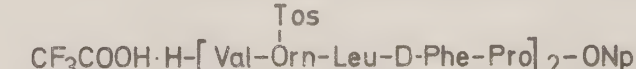
Von diesen hat das Gramicidin S das größte analytische und präparative Interesse gefunden. Es wurde 1944 von Gause und Brazhnikova [45] als kristallisiertes Dihydrochlorid aus Kulturen von Bacillus brevis isoliert.

Die Struktur des gegen grampositive Bakterien wirksamen Antibiotikums wurde in der Folgezeit von Synge [46], Sanger [47], Consden und Mitarbeiter [48] und Battersby und Craig [49] aufgeklärt. Es zeigte sich, daß Gramicidin S die Struktur eines cyclischen Decapeptids 6 mit freien δ-Aminogruppen am Ornithin besitzt.



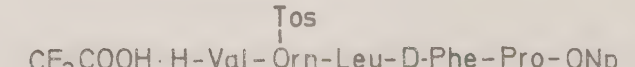
6

Die erste Synthese des Gramicidin S - und damit die erste Synthese eines Cyclopeptid-Antibiotikums überhaupt - gelang Schwyzer und Sieber [50-52] 1956 durch Cyclisierung des Decapeptid-p-nitrophenylesters 7 und anschließende Detosylierung



7

mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Durch dimerisierende Cyclisierung des Pentapeptid-p-nitrophenylesters 8 und Detosylierung konnten Schwyzer und Sieber [53] ebenfalls Gramicidin S erhalten.

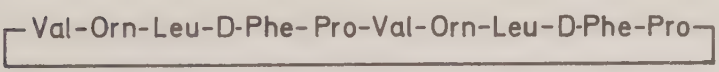


8

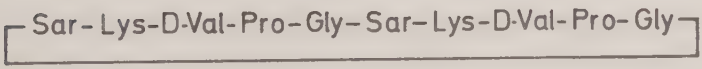
In der Folgezeit wurden von Schwyzer und Mitarbeitern [52-55], Halstrom und Klostermeyer [56], Izumiya und Mitarbeitern [57-71] und Okawa und Mitarbeitern [72] eine große Zahl Gramicidin S-ähnlicher Cyclodecapeptide dargestellt, mit dem Ziel, Antibiotika mit breiterem Wirkungsspektrum und größerem therapeutischem Index zu erhalten, sowie Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität aufzuklären.

Das Cyclodecapeptid 9, das sich aus dem geschützten linearen Pentapeptidester 10 - einem Zwischenprodukt bei der Synthese des Cyclopentapeptids 5 - erhalten ließe, besitzt in Übereinstimmung mit Gramicidin S (6) folgende grundlegende Strukturelemente:

1. Cyclodecapeptid mit C_2-Symmetrie (2-zählige Drehachse)
2. zwei D-Aminosäuren
3. zwei L-Prolin-Reste
4. zwei basische Aminosäuren mit freier ω-Aminogruppe.

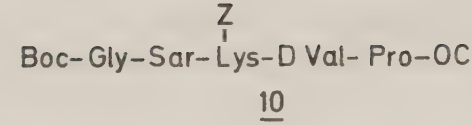


6



9

Ob die Übereinstimmung in diesen Punkten ausreicht, eine vergleichbare biologische Aktivität hervorzurufen, ließe sich nur nach Synthese des Cyclodecapeptids 9 entscheiden.



Boc-Gly-Sar-Lys(Z)-D Val- Pro-OCH_3

10

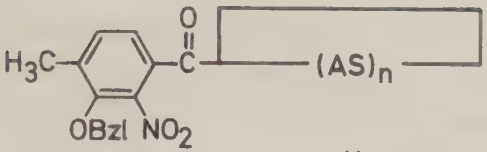
Ziel der vorliegenden Arbeit war also, ausgehend von dem gemeinsamen Zwischenprodukt 10 das Actinomycin-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar und das Gramicidin S-ähnliche Cyclodecapeptid 9 darzustellen und die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften dieser Antibiotika-verwandten Verbindungen zu untersuchen.

II. Zur Synthese von Actinomycinen und Cyclopeptiden

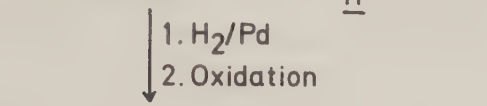
1. Actinomycine

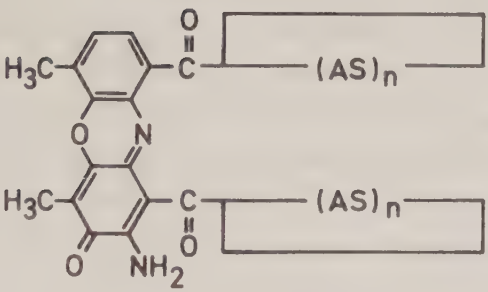
Für die Synthese von Actinomycinen und Actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden bieten sich mehrere Verfahren an. Sie unterscheiden sich in der Art des Peptidringschlusses, der durch die Knüpfung einer Amid- [28,73] oder einer Esterbindung [23,29] erfolgen kann, und durch die zeitliche Aufeinanderfolge von Ringschlußreaktion und Aufbau des Chromophors.

Bei Actinomycin-Analogen mit Cyclopeptiden empfiehlt es sich, die Cyclisierung vor dem Aufbau des Chromophors vorzunehmen, da sonst eine Dimerisierung bei der Cyclisierung nicht ausgeschlossen werden kann, denn durch den Chromophor werden zwei zu cyclisierende Peptidketten eng benachbart zusammengehalten, so daß die Bedingungen des Verdünnungsprinzips nicht erfüllt sind.



11





12

AS = Aminosäure

Man kann nun entweder das zunächst aufgebaute Cyclopeptid nach Abspaltung der Schutzgruppe mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure zum Zwischenprodukt 11 verknüpfen [24-26] (Methode A), oder den 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest - quasi als Schutzgruppe - zu Beginn der Synthese des Cyclopeptids einführen [74] (Methode B). Man erhält so ebenfalls das Zwischenprodukt 11, das sich dann nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzylgruppe und Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe in das Actinomycin-Analoge 12 überführen läßt.

2. Cyclopeptide

Bei der Cyclisierung von linearen Peptiden mit ungerader Zahl von Aminosäureresten beobachtet man des öfteren eine Dimerisierung, und man erhält Cyclopeptide mit der doppelten Anzahl von Ringgliedern, während bei geradzahligen Peptiden keine Verdopplung eintritt.

Aufgrund dieser Beobachtung postulierten Schwyzer und Mitarbeiter [53,75] für Cyclopeptide mit 4n + 2 Aminosäureresten im Ring (n = ganze, positive Zahl) eine antiparallele Faltblattstruktur mit starker intramolekularer Wasserstoffbrückenbindung. Diese Konformation wurde inzwischen für Gramicidin S (6) in der kristallinen Phase [76] und in Lösung [77,78] sowie für andere Cyclopeptide [79] nachgewiesen.

Da diese energetisch günstige Konformation auch schon im Übergangszustand eingenommen werden kann, ist die Cyclisierung von linearen Peptiden mit 4n + 2 Aminosäuren begünstigt. Dennoch lassen sich auch Cyclopeptide mit ungerader Zahl von Aminosäureresten im Ring, z.B. Cyclopentapeptide darstellen.

Wie ein Überblick über die vorliegenden experimentellen Ergebnisse [80] zeigt, hängt das Verhältnis der miteinander konkurrierenden Cyclisierung und Cyclodimerisierung von folgenden Faktoren ab:

1. Konzentration: höhere Verdünnung begünstigt die direkte Cyclisierung.
2. Größe der Amino- und Carboxyl-endständigen Aminosäure im Linearpeptid: kleine endständige Aminosäuren drängen die

Cyclodimerisierung zurück. Besonders bei der Cyclisierung von Linearpeptiden mit N-terminalem Glycin entsteht praktisch nur monomeres Cyclopeptid.

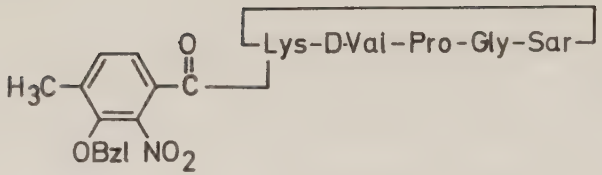
3. Die Anwesenheit einer Aminosäure mit entgegengesetzter Konfiguration am α-C-Atom in der Peptidkette scheint ebenfalls die Cyclisierung zu erleichtern.

Bei der Reaktion von linearen Peptiden mit ungerader Zahl von Aminosäureresten unter Cyclisierungsbedingungen wird eine monomere Cyclisierung nur eintreten, wenn die Sequenz des linearen Vorläufers entsprechend dem oben Gesagten eine relativ schnelle intramolekulare Reaktion zuläßt. Tragen jedoch die endständigen Aminosäuren raumerfüllende Reste, oder wird die Annäherung der Enden der Peptidkette aus anderen Gründen erschwert, so wird die intramolekulare Reaktion verlangsamt, und es kann trotz der hohen Verdünnung (10^{-3} - 10^{-4} M) zur Reaktion mit einem zweiten Peptidmolekül kommen. Das hierbei entstehende Dimere kann nun entweder aus einer für die Cyclisierung günstigen Konformation, z.B. der antiparallelen ß-Faltblattstruktur, das Cyclodimere bilden, oder es werden überhaupt keine cyclischen Produkte gebildet.

III. Synthese des Actinomycins-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33)

1. Vorbemerkungen

Die in II.1. (Seite 11) erwähnte Möglichkeit (Methode B), bei der Synthese des zum Aufbau von 33 benötigten Zwischenprodukts 13 den 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest an der ε-Amino-



13

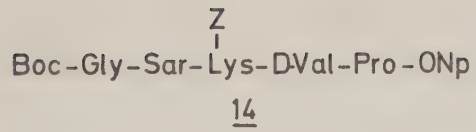
gruppe des Lysins als (N^{ε}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-lysin-Derivat schon beim Aufbau des Pentapeptids einzuführen, wurde aus folgenden Gründen verworfen:

1. Derivate der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure sind lichtempfindlich. Dies erschwert die Handhabung und Reinigung der Zwischenprodukte.
2. Der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest läßt sich - im Gegensatz zu einer echten Schutzgruppe - nicht wieder entfernen, ohne gleichzeitig die Peptidbindungen zu spalten. Damit wäre es unmöglich gewesen, das lineare Pentapeptid für die Synthese anderer Peptide zu verwenden.

Methode A bot dagegen die Möglichkeit, das Cyclopentapeptid 5 auf dem von Brockmann und Graef [35,36] beschriebenen Syntheseweg darzustellen, wodurch eine Kontrolle der Zwischenprodukte möglich war.

Für diesen Syntheseweg sprachen außerdem folgende Punkte:

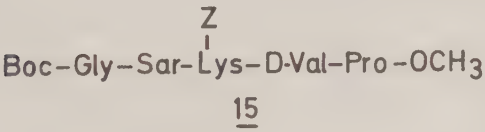
1. Die Sequenz des linearen Vorläufers 14 begünstigt nach dem in II.2. (Seite 13) Gesagten die monomere Cyclisierung, dementsprechend war von Brockmann und Graef [35,36]



14

keine Cyclodimerisierung beobachtet worden.

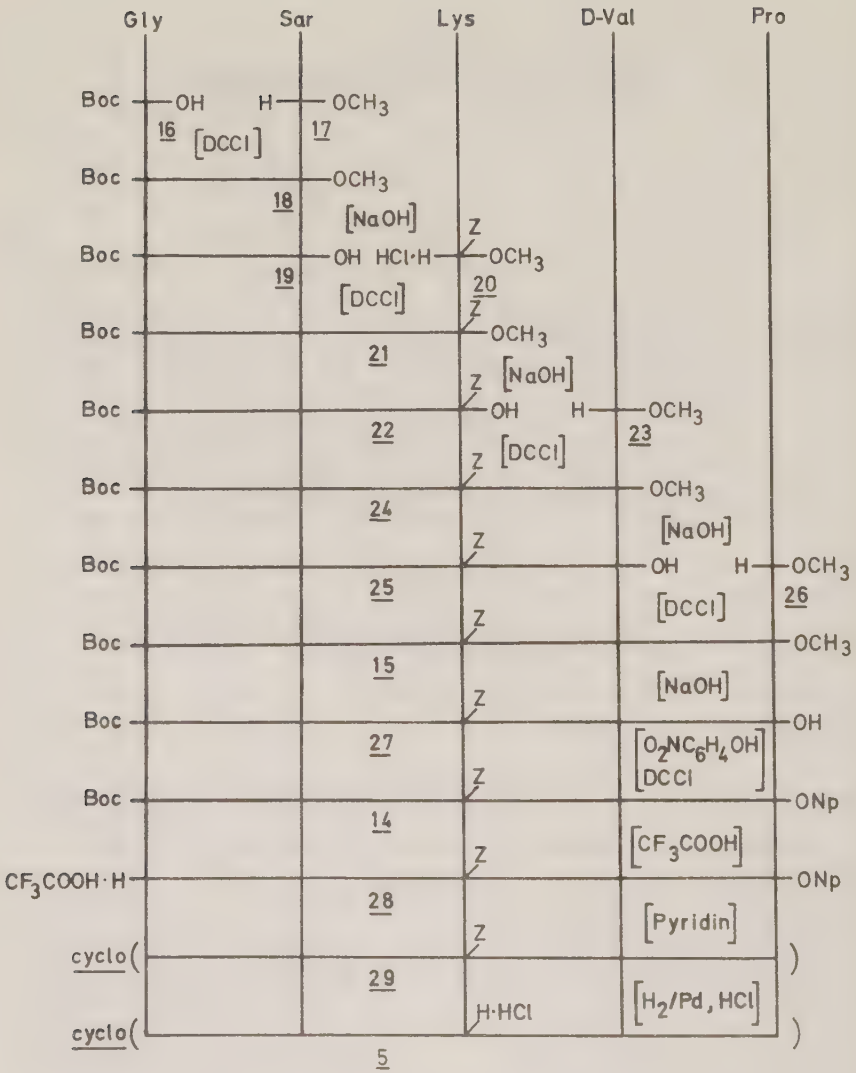
2. Obgleich bei der Anwendung der p-Nitrophenylester-Methode Racemisierung eintreten kann [34], ist bei der Cyclisierung von 14 keine Racemisierung zu befürchten, da als C-terminale Aminosäure Prolin vorliegt.
3. Ausgehend von den geschützten Pentapeptiden 14 oder 15 ist die Synthese weiterer Peptide möglich.



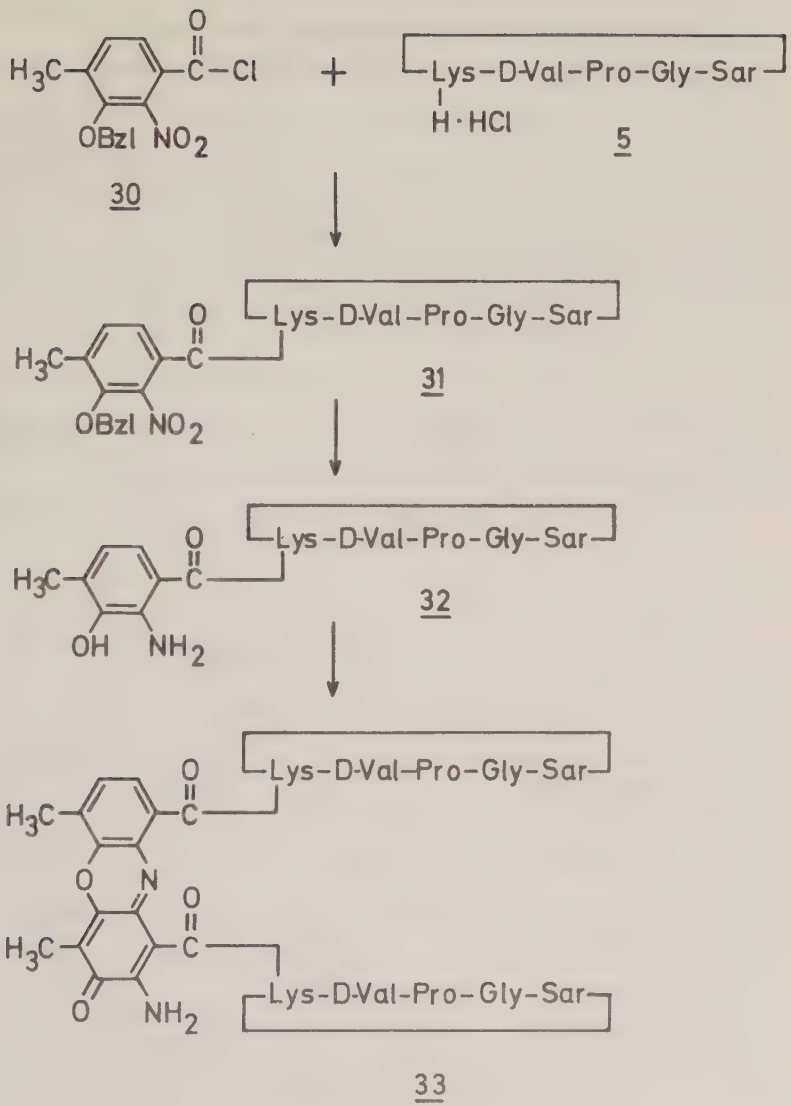
15

Der Syntheseplan für das Cyclopentapeptid 5 ist in Schema 1 wiedergegeben, Schema 2 zeigt den Syntheseplan für das Actinomycin-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33).

Die nur mäßige Ausbeute bei der Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe am Glycin in 14 mit Chlorwasserstoff in trockenem Methylenchlorid [35,36] sollte sich mit wasserfreier Trifluoressigsäure [81] als Abspaltungsreagenz verbessern lassen.

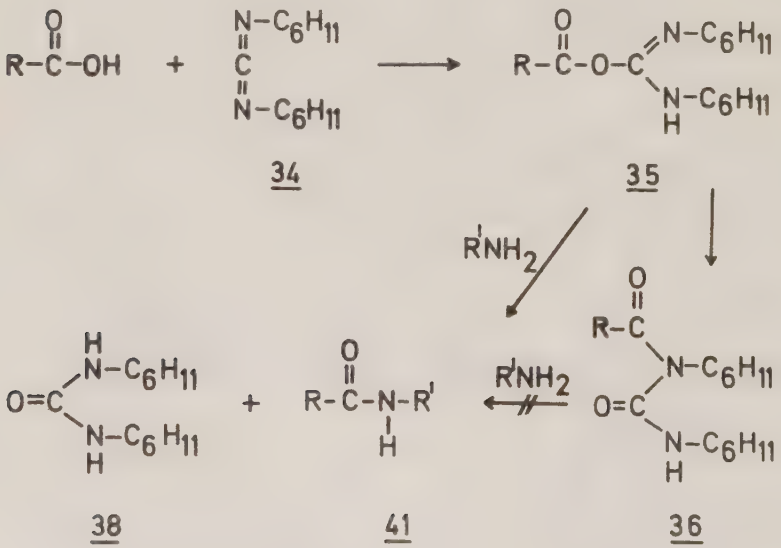


Schema 1 Synthese von cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (5)



Schema 2 Synthese des Actinomycins-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33)

Um bei der Peptidkupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid (34) [82] die Gefahr der Racemisierung möglichst gering zu halten, wurde die Reaktion generell bei -10° durchgeführt. Hierdurch läßt sich auch die Bildung des Acylharnstoffs 36 zurückdrängen, der durch Acylwanderung aus dem O-Acylisoharnstoff 35 entsteht. Da der Acylharnstoff 36 nicht genügend aktiviert ist, um zum Amid 37 und Dicyclohexylharnstoff (38) aminolysiert zu werden, verringert seine Entstehung die Ausbeute des erwünschten Produkts 37 und erschwert die Reinigung.



Die Bildung des Acylharnstoffs 36 wird durch überschüssige Basen, besonders Triäthylamin [83,84] begünstigt. Aus diesem Grund wurden die freien Aminosäureester wenn mörlich vor der Kupplung im Vakuum destilliert.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin (16) wurde aus Glycinäthylester-hydrochlorid über Isocyanatoessigsäure-äthylester [85], Addition von tert.-Butanol in Gegenwart von Pyridin [86] und alkalische Verseifung des Äthylesters erhalten.

Die Methylester-hydrochloride von Sarkosin, D-Valin und L-Prolin stellte man nach der Thionylchlorid-Methode von Brenner und Huber [87] dar. Vor der Kupplung wurden die Ester mit Triäthylamin in Freiheit gesetzt und im Vakuum destilliert.

Die Darstellung von N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylesterhydrochlorid (20) gelang am besten auf dem von Boissonnas und Mitarbeitern [88] beschriebenen Weg über N.N'-Di-benzyloxycarbonyl-L-lysin und N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-N^{α}-carbonsäureanhydrid.

2. Synthese des Cyclopentapeptids 5

Zur Darstellung von tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosinmethylester (18) kuppelte man N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin (16) und Sarkosinmethylester (17) mit Dicyclohexylcarbodiimid (34) in abs. Tetrahydrofuran bei -10°.

Das geschützte Dipeptid 18, das Brockmann und Graef [35,36] nur als Öl erhalten hatten, begann beim scharfen Trocknen durchzukristallisieren. Mit Hilfe von Impfkristallen ließ sich 18 aus Cyclohexan umkristallisieren, und man isolierte 18 in 73 proz. Ausbeute als farblose Prismen vom Schmp. $70-72^{\circ}$.

Die höheren Peptide konnten jedoch wie bei Brockmann und Graef nicht kristallisiert erhalten werden, vom Tripeptid 22 ab

erstarrten sie zu trockenen Schäumen. Diese waren dünnschichtchromatographisch einheitlich, gaben befriedigende Elementaranalysen, und die Werte der spezifischen Drehung stimmten mit den von Brockmann und Graef [35,36] mitgeteilten überein.

Mit wäßrigem Natriumhydroxid in Aceton wurde das geschützte Dipeptid 18 zu 19 verseift und das ölige Produkt mit Dicyclohexylcarbodiimid und N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylesterhydrochlorid (20) zum geschützten Tripeptid 21 umgesetzt.

Nach der Verseifung von 21 zu 22 mit wäßrigem Natriumhydroxid in Aceton kuppelte man 22 und D-Valinmethylester (23) mit Dicyclohexylcarbodiimid zum geschützten Tetrapeptid 24.

Die Verseifung von 24 mit wäßrigem Natriumhydroxid in Aceton lieferte das aminogeschützte Tetrapeptid 25.

Ebenfalls nach der Carbodiimid-Methode wurde nun 25 mit L-Prolinmethylester (26) zum geschützten Pentapeptid 15 umgesetzt, das nach Verseifung mit wäßrigem Natriumhydroxid in Aceton zum aminogeschützten Pentapeptid 27 führte. Hieraus erhielt man mit p-Nitrophenol und Dicyclohexylcarbodiimid den p-Nitrophenylester 14, der im UV-Spektrum die für p-Nitrophenylester typische Absorptionsbande bei 267 nm zeigte.

Zur Bestimmung des p-Nitrophenylester-Gehalts nach Schwyzer und Gorup [89] verseifte man eine Probe mit wäßrigem Natriumhydroxid und ermittelte nach Verdünnung mit Methanol die Extinktion des p-Nitrophenolat-Ions bei 400 nm. In einer mit Äther verriebenen Probe von 14 (um freies p-Nitrophenol zu entfernen) stellte man so einen p-Nitrophenylester-Gehalt von 97 % fest.

Wie erwartet gelang die Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe mit wasserfreier Trifluoressigsäure [81] in besserer Ausbeute als die von Brockmann und Graef [35,36] beschriebene Abspaltung mit Chlorwasserstoff in Methylenchlorid, die das zu 28 analoge Hydrochlorid nur in 46 proz. Ausbeute geliefert hatte. Dazu versetzte man eine Lösung von 14 in Anisol bei 0° mit wasserfreier Trifluoressigsäure und dampfte nach 45 Min. bei maximal 30° die Trifluoressigsäure im Vakuum ab. Das zurückbleibende Öl wurde mehrfach mit Äther/Petroläther verrieben und lieferte so bis zu 94 % 28 als farbloses, trockenes Pulver mit einem p-Nitrophenylester-Gehalt zwischen 70 und 80 %. 28 war Ninhydrin-positiv und lief im Hochspannungs-Elektropherogramm (Essigsäure/ Ameisensäure/Wasser pH 2) einheitlich als Kation, wobei der p-Nitrophenylester beim Lösen im Puffer verseift wurde.

Der Pentapeptid-p-nitrophenylester 28 wurde ohne weitere Reinigung und Charakterisierung zur Cyclisierung eingesetzt, die in Pyridin bei 60° durchgeführt wurde.

Um die Ausbeute an geschütztem Cyclopentapeptid 29 zu erhöhen, verlängerte man bei einem 5 mMol-Ansatz die Zeitdauer, in der die Lösung von 28 in Dimethylformamid mit 3 % Eisessig in 3.2 l abs. Pyridin getropft wurde, auf 8 Stdn., so daß die effektive Konzentration des aktivierten Linearpeptids 28 ungefähr 10^{-4} M betrug. Hierbei bewährte sich die Verwendung eines Dosiertrichters mit Kegelventil (Fa. Normag), mit dem eine gleichmäßige Dosierung erzielt werden konnte.

Die Lösung des öligen Rohprodukts in Chloroform befreite man zunächst mit n Salzsäure und Natriumhydrogencarbonat-Lsg. von linearen Peptiden, p-Nitrophenol und anderen sauren und basischen Verunreinigungen, adsorbierte dann die Neutralstoffe an basischem Aluminiumoxid und eluierte mit Methanol. Zur weiteren Reinigung chromatographierte man auf präparativen Kieselgelplatten PF_{254} mit Äthylacetat/Methanol (3:1) als Laufmittel, wobei pro Platte 20 x 40 cm 600-700 mg Rohprodukt aufgetragen wurden. Die einzelnen Zonen gaben sich durch Löschung der Fluoreszenz bei 254 nm zu erkennen. Das aus der Hauptzone isolierte Material wurde noch einmal unter den gleichen Bedingungen chromatographiert, und man erhielt so nach Umfällen aus Chloroform/n-Hexan das geschützte Cyclopentapeptid 29 als farbloses Pulver in bis zu 59 proz. Ausbeute.

Die spezifische Drehung von 29 wurde mit $[\alpha]_D^{20}$: $-29.4 \pm 0.5^\circ$ (c = 2.0, Äthanol) etwas niedriger gefunden, als von Brockmann und Graef [35,36] mit $[\alpha]_D^{20}$: -35.2° (c = 1.9, Äthanol) angegeben.

Das NMR-Spektrum von 29 zeigt nicht - wie sonst häufig beobachtet - eine Verschärfung der Signale beim Übergang vom Linearpeptid zum Cyclopeptid. Das spricht dafür, daß 29 nicht in einer bevorzugten Konformation mit relativ langer Lebensdauer vorliegt, sondern sich mehrere energetisch gleichwertige Konformationen ineinander umwandeln.

Zur Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe hydrierte man 29 in Methanol mit Palladium unter Zusatz der äquivalenten Menge Salzsäure. Das im Vakuum getrocknete Rohprodukt fällte

man aus Methanol/abs. Äther um und erhielt so das Cyclopentapeptid-hydrochlorid 5 in 86 proz. Ausbeute als farbloses Pulver. 5 war einheitlich im Papierchromatogramm und Elektopherogramm, die spezifische Drehung wurde mit $[\alpha]_D^{20}$: -38.8 ± 0.5° (c = 2.5, Äthanol) wiederum etwas niedriger gefunden, als von Brockmann und Graef [35,36] berichtet (-41.2°, c = 2.4, Äthanol).

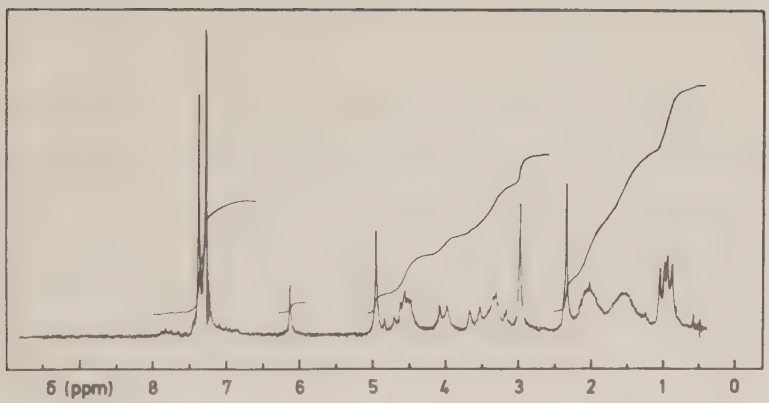
Das geschützte Cyclopentapeptid 29 ist in Wasser bei Raumtemperatur nur mäßig löslich, während das Hydrochlorid 5 der Cyclopentapeptidbase sehr gut wasserlöslich ist. Zur Prüfung der Frage, ob durch Komplexbildung von 29 mit 5 - wozu in erster Linie hydrophobe Wechselwirkungen beitragen könnten - die Löslichkeit von 29 in Wasser erhöht wird, wurde die Wasserlöslichkeit von 29 bei 25° ohne und mit 5 (2.5 g / 100 ccm) quantitativ bestimmt. Tatsächlich fand man eine Steigerung um 23 ± 8 %, jedoch ist eine Erhöhung in dieser Größenordnung nicht signifikant für eine Komplexbildung von 29 mit 5, sie könnte auch auf einen unspezifischen Salzeffekt zurückgeführt werden.

3. Synthese des Actinomycins-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33)

Zur Darstellung des 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-cyclopeptids 31 wurde das Cyclopentapeptid-hydrochlorid 5 mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid (30) in Methylenchlorid mit N-Äthylmorpholin als Base bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Rohprodukt reinigte man durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel und fällte anschließend aus Chloro-

form/n-Pentan um. Man erhielt so 77 % 31 als dünnschichtchromatographisch einheitliches, farbloses Pulver, das durch Analyse und Aminosäurebestimmung charakterisiert wurde. Wie der zu niedrige Wert für Lysin zeigt, wird die Amidbindung zwischen der ε-Aminogruppe des Lysins und der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure unter den üblichen Hydrolysebedingungen (6n HCl, 110°, 24 Stdn.) nicht quantitativ gespalten. Im Chromatogramm des Hydrolysats trat infolgedessen zusätzlich zu den Zonen der fünf Aminosäuren eine weitere Ninhydrin-positive Zone auf, die vermutlich aus N^{ε}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-L-lysin bestand.

Das NMR-Spektrum von 31 in Deuterochloroform (Abbildung 1) läßt nach Austausch der Amidprotonen mit D_2O/Trifluoressigsäure folgende Signale erkennen: Die nicht äquivalenten Methylgruppen des Valins geben zwei übereinanderliegende Dubletts mit J = 10 Hz bei δ = 0.93 und 0.99 ppm, daneben absorbieren mit Schwerpunkt bei δ = 1.5 ppm die Lysin-C-4- und C-5-Protonen. Bei δ = 2.0 ppm liegt das Multiplett der Prolin-C-3- und C-4-H, von dem die Lysin-C-3- und Valin-C-3-Protonen überdeckt werden. Bei δ = 2.34 ppm absorbiert die Aromat-Methylgruppe, die N-Methylgruppe des Sarkosins liefert das Singlett bei δ = 2.98 ppm. Im Bereich zwischen δ = 3.0 und 5.0 ppm liegen die nicht näher identifizierten α-C-H-Signale von Glycin, Sarkosin, Lysin, Valin und Prolin, sowie die Lysin-C-6-H und die Prolin-C-5-H. Das Singlett der benzylischen Protonen bei δ = 4.95 ppm und die Aromatprotonen bei δ = 7.37 ppm stammen vom 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest. Vor dem Deuterium-Austausch absorbierten die 4 Amidprotonen (Glycin, Valin, α- und ε-L-H



Abbild. 1 100 MHz-NMR-Spektrum von cyclo-(N^{ε}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (31) in Deuterochloroform nach Austausch der Amidprotonen mit D_2O/Trifluoressigsäure

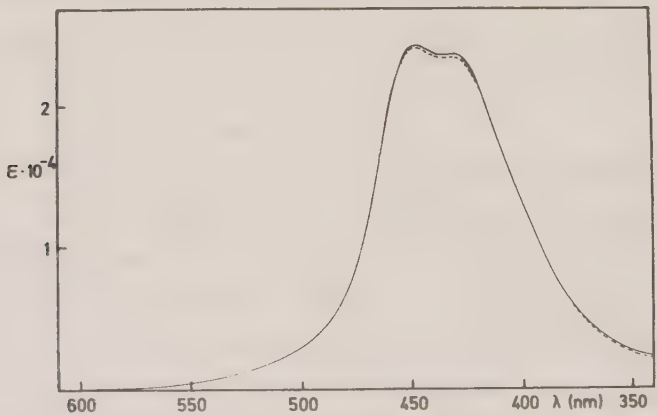
vom Lysin) in zwei Gruppen zu je zwei Protonen zwischen δ = 7.0 - 7.2 und 7.7 -7.9 ppm.

Verbindung 31 hydrierte man mit Palladium in Methanol zum intensiv blau fluoreszierenden o-Aminophenol-Derivat 32, das im UV-Spektrum in Methanol eine Bande mit λ_{max} 323 nm zeigte. 32 wurde nicht isoliert, sondern direkt mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in gepufferter Lösung bei pH 7.2 zum Actinomycin 33 oxidiert. Das Rohprodukt trennte man an einer Cellulosesäule und fällte den Inhaltsstoff der Hauptzone aus Chloroform/Cyclohexan um. Man erhielt so 33 in 78 proz. Ausbeute als gelbrotes, amorphes Pulver vom Schmp. 189-191°, das durch Analyse, UV-Spektrum und Farbreaktion mit wäßrigem Natriumhydroxid in

Dimethylformamid charakterisiert wurde. Der molare Extinktionskoeffizient von 33 in Wasser zeigte mit ε = 24 500 bei 448 nm die erwartete Größe.

Im Gegensatz zu den nativen Actinomycinen, die einen negativen Temperaturkoeffizienten der Wasserlöslichkeit zeigen und bei Raumtemperatur schlecht wasserlöslich sind (< 0.1 g / 100 ccm bei 20°), ist 33 sehr gut wasserlöslich. Wegen Substanzmangels konnte die Löslichkeit nicht quantitativ bestimmt werden, sie liegt bei 3° und bei 20° über 20 g / 100 ccm.

Das NMR-Spektrum von 33 in Chloroform zeigt im Peptidteil keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem von 31, man findet weiterhin nur sehr breite Signalgruppen, die sich auch beim Austausch mit D_2O nicht differenzieren.



Abbild. 2 Absorptionsspektrum von Actinomycin-Lys-D-Val-L-Pro-Gly-Sar (33) in BPES-Puffer ohne —— und mit ----- Kalbsthymus-DNS (0.4 mg/ccm)

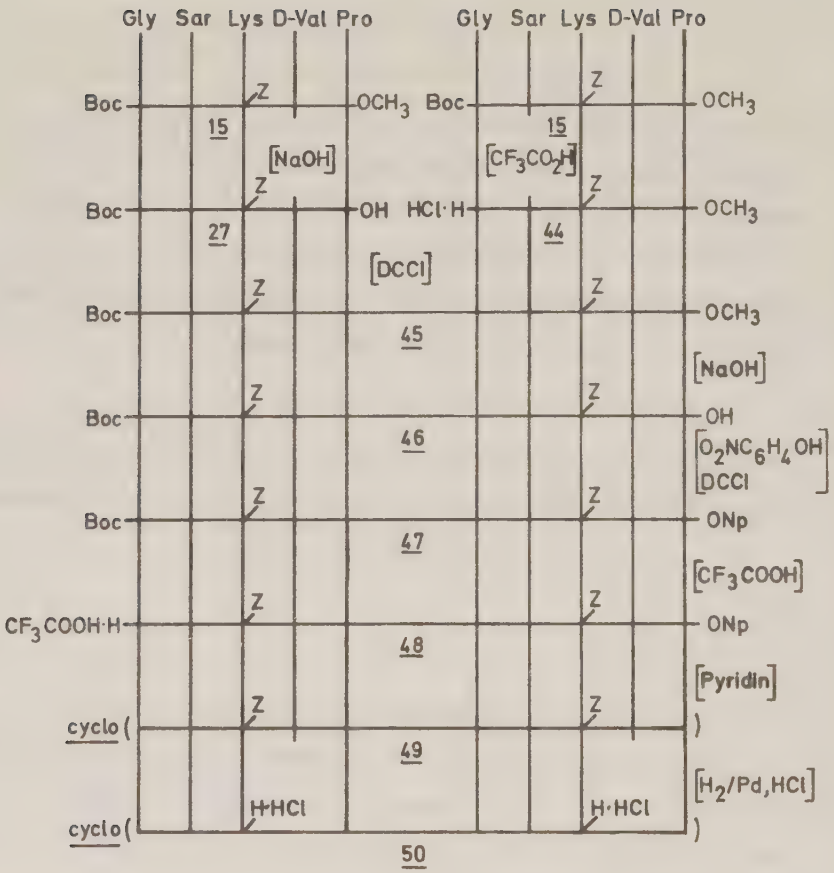
Beim Zusatz von Kalbsthymus-DNS zur Lösung von 33 in BPES-Puffer tritt nur ein sehr geringer Spektraleffekt auf, der auf eine sehr schwache Komplexbildung mit DNS hinweist (Abbildung 2). Offensichtlich sind die Peptidringe von 33 im Gegensatz zu den Peptidlactonringen der nativen Actinomycine nicht in der Lage, einen Komplex von 33 mit DNS durch Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen zu stabilisieren. In Übereinstimmung hiermit zeigte 33 im Plättchendiffusionstest keinerlei Wirkung gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

IV. Synthese des Cyclodecapeptids cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (50)

1. Vorbemerkungen

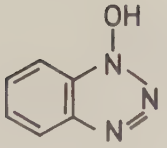
Das zunächst benötigte offenkettige Decapeptid 45 sollte durch Kondensation zweier Pentapeptid-Fragmente synthetisiert werden. Diese waren aus dem vorhandenen geschützten Pentapeptid 15 durch Abspaltung der Carboxyl- bzw. Amino-Schutzgruppe zu 27 und 44 zugänglich (siehe Schema 3).

Als Kupplungsmethode für die Verknüpfung der Peptidfragmente 27 und 44 wurde die inzwischen von König und Geiger [90,91] veröffentlichte Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid (34) und 1-Hydroxy-benzotriazol (39) [90] bzw. 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (40) [91] gewählt. Nach den Angaben von König und Geiger ist hiermit eine racemisierungsfreie

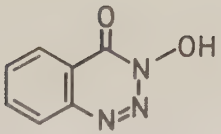


Schema 3 Synthese von cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (50)

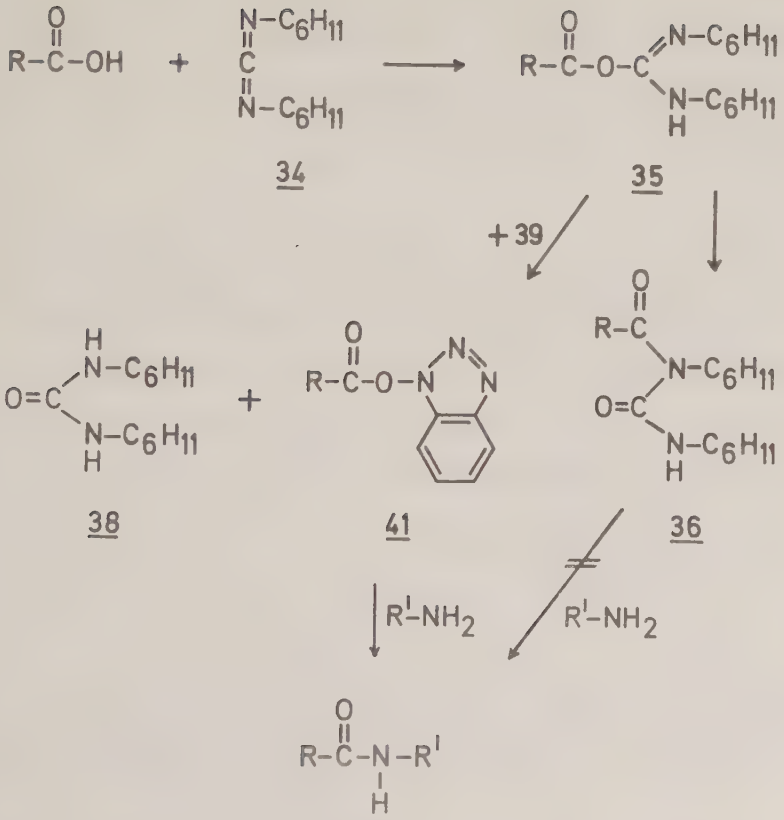
Peptidsynthese möglich, bei der auch die Bildung des N-Acylharnstoffs 36 unterdrückt wird. Nach Geiger [92] beruht die Wirkung dieser N-Hydroxyverbindungen auf der schnellen Reaktion



39



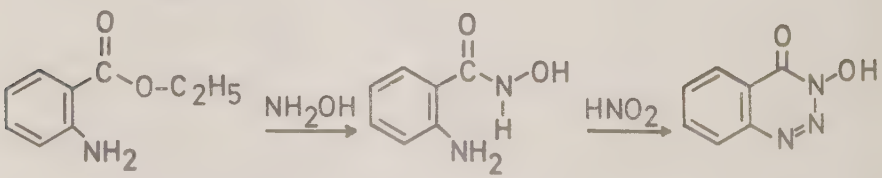
40


R–C–OH
+
N–C6H11
C
N–C6H11
34
R–C–O–C
N–C6H11
N–C6H11
H
35
+39
O=C
N–C6H11
N–C6H11
H
38
+
R–C–O–N
N
N
41
R–C
N–C6H11
O=C
N–C6H11
H
36
R'–NH2
R'–NH2
R–C–N–R'
H
37

von 39 oder 40 mit dem zunächst aus der Carboxylkomponente und Dicyclohexylcarbodiimid (34) gebildeten Isoharnstoffderivat 35, welches äußerst reaktionsfähig und deshalb racemisierungs- und umlagerungsgefährdet ist. Der mit der N-Hydroxyverbindung entstehende aktivierte Ester 41 setzt sich dann mit der Aminokomponente zum gewünschten Produkt 37 um. Die direkte Aminolyse des Isoharnstoffs 35 durch die Aminokomponente verläuft dagegen wesentlich langsamer als die Reaktion mit der N-Hydroxyverbindung, so daß durch die verlängerte Lebensdauer von 35 Racemisierung an der carboxyl-endständigen Aminosäure und Umlagerung von 35 in den Acylharnstoff 36 eintreten kann. Da der Acylharnstoff 36 zur Aminolyse nicht genügend aktiviert ist, verschlechtert er Ausbeute und Reinheit des Produkts 37.

Im gegebenen Fall, Verknüpfung der beiden Pentapeptidfragmente 27 und 44, war eine Racemisierung bei der Kupplung von vornherein nicht zu befürchten, da als C-terminale Aminosäure Prolin vorlag.

Während 1-Hydroxy-benzotriazol (39) von Fa. Fluka bezogen wurde, wurde das 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (40) aus Anthranilsäure-äthylester (42) über die 2-Aminobenzhydroxamsäure (43) erhalten [93].



42 43 40

Bei kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von Losse und Mitarbeitern [94] und Schnabel und Mitarbeitern [95] über die acidolytische Abspaltung von Peptid-Schutzgruppen stellte sich heraus, daß die Benzyloxycarbonyl-Gruppe unter den Standardbedingungen zur Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe (wasserfreie Trifluoressigsäure oder Chlorwasserstoff in organischen Lösungsmitteln) keineswegs wie bisher angenommen [34] völlig stabil ist. Schnabel und Mitarbeiter [95] schlagen zur selektiven Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe die Verwendung von 70 proz. wäßriger Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur oder Bortrifluorid-ätherat in organischen Lösungsmitteln vor.

2. Verlauf der Synthese

Die Aminoschutzgruppe von 15 wurde mit 70 proz. wäßriger Trifluoressigsäure entfernt. Da das Trifluoracetat-Ion bei der nachfolgenden Kupplung zur Trifluoracetylierung geführt hätte, wurde das Reaktionsprodukt mit Natriumhydrogencarbonat in den freien Peptidester und anschließend mit Salzsäure in das Hydrochlorid überführt. Das Rohprodukt trocknete man im Vakuum über Kaliumhydroxid und fällte dann aus Chloroform/abs. Äther um. Man erhielt so das Pentapeptidester-hydrochlorid 44 in 84 proz. Ausbeute als farbloses, trockenes Pulver, das dünnschichtchromatographisch und elektropherographisch einheitlich war und durch Elementaranalyse, Aminosäurebestimmung und NMR-Spektrum charakterisiert wurde.

Das Pentapeptidfragment 27 mit freier Carboxylgruppe war bereits

als Zwischenstufe bei der Synthese des Cyclopentapeptids 5 beschrieben worden [35,36].

Die Fragmentkondensation von 27 und 44 mit Dicyclonexylcarbodiimid verlief bei Zusatz von 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (40) mit höherer Ausbeute als bei der Verwendung von 1-Hydroxy-benzotriazol (39). In beiden Fällen wurde das Rohprodukt durch Chromatographie an Aluminiumoxid gereinigt, und man erhielt dünnschichtchromatographisch einheitliche Produkte mit identischer spezifischer Drehung.

Das geschützte Decapeptid 45 charakterisierte man durch Elementaranalyse und Aminosäurebestimmung.

Die Verseifung der Methylester-Gruppe in 45 gelang mit wäßrigem Natriumhydroxid in Aceton. Das Rohprodukt reinigte man durch Gelfiltrations-Chromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol und erhielt so das aminogeschützte Decapeptid 46 in 79 proz. Ausbeute als farblosen Schaum. 46 war dünnschichtchromatographisch einheitlich und wurde durch Elementaranalyse und Aminosäurebestimmung charakterisiert.

Zur Cyclisierung setzte man 46 zunächst mit p-Nitrophenol und Dicyclohexylcarbodiimid zum p-Nitrophenylester 47 um. Da die erste Veresterung, wie die spektralphotometrische p-Nitrophenylester-Bestimmung [89] ergab, nur in 58 proz. Ausbeute zu 47 geführt hatte, wurde das Produkt noch einmal der gleichen Reaktion unterworfen. Hierdurch stieg der p-Nitrophenylester-Gehalt auf 82 %. Ähnliche Schwierigkeiten bei der Veresterung eines Decapeptids mit Dicyclohexylcarbodiimid und p-Nitrophenol wurden

kürzlich auch von Ludescher und Schwyzer [96] mitgeteilt.

Nach Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe mit Trifluoressigsäure wurde die Cyclisierung wie beim Cyclopentapeptid in heißem abs. Pyridin durchgeführt. Die Neutralstoffe des Rohprodukts reinigte man durch Chromatographie über Aluminiumoxid, Kieselgel und Sephadex LH 20 und erhielt nach Umfällen aus Chloroform/n-Hexan das geschützte Cyclodecapeptid 49 in 25 proz. Ausbeute (bezogen auf das aminogeschützte Decapeptid 46) als farbloses Pulver vom Schmp. 125-130°. 49 war dünnschichtchromatographisch einheitlich und wurde durch Elementaranalyse, Aminosäurebestimmung und die kryoskopische Bestimmung der Molmasse charakterisiert.

Die beiden Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen entfernte man hydrogenolytisch mit Palladium in Methanol, das die äquivalente Menge Salzsäure enthielt. Das Cyclodecapeptid-dihydrochlorid 50 fiel nach Gelchromatographie über Sephadex LH 20 in Methanol und Umfällen aus Methanol/abs. Äther in 53 proz. Ausbeute als farbloses Pulver an. 50 war Ninhydrin-positiv, dünnschichtchromatographisch und elektropherographisch einheitlich und lieferte eine befriedigende Elementaranalyse.

Das Dihydrochlorid 50 des Cyclodecapeptids löst sich leicht in Wasser, und auch die freie Base ist so gut wasserlöslich, daß sie sich aus wäßriger Lösung mit den gebräuchlichen Lösungsmitteln nicht extrahieren läßt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Cyclodecapeptid-dikations im Elektropherogramm ist trotz doppelter Ladung nur um etwa 10 %

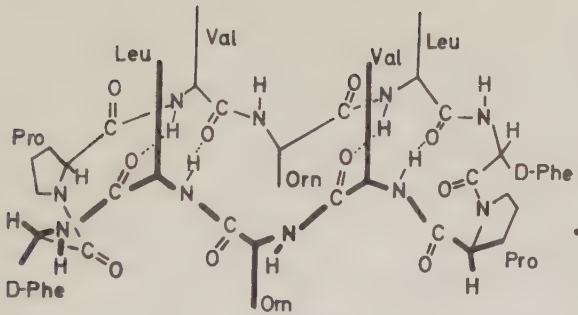
größer als die des Cyclopentapeptid-kations, weil gleichzeitig der Teilchendurchmesser ansteigt. Ähnliche Verhältnisse fanden z.B. Kondo und Izumiya [63] beim [1.1'-Glycin]Gramicidin S und [1-Glycin]Cyclosemigramicidin S.

V. Untersuchung des Cyclodecapeptid-dihydrochlorids 50 auf antibiotische Wirksamkeit und Vergleich mit Gramicidin S (6)

Das Cyclodecapeptid-dihydrochlorid 50 erwies sich im Plättchendiffusionstest als nicht wirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus. Dieser Befund läßt sich durch Vergleich von 50 mit Gramicidin S (6) und analogen Cyclodecapeptiden erklären.

Gramicidin S (6) greift an der Cytoplasmamembran an und führt ähnlich wie anionische und kationische Detergentien zu einer Disorganisation der Membran, wodurch die Zelle niedermolekulare Metaboliten verliert und wahrscheinlich lytische Enzyme freigesetzt werden, die zusammen mit dem Antibiotikum die Zellwand zerstören [97].

In Übereinstimmung mit dieser Detergens-ähnlichen Wirkung des Gramicidin S stehen die Untersuchungen über die Konformation von Gramicidin S im Kristall [76] und in Lösung [77,78]. Wie Abbildung 3 zeigt, liegen danach die hydrophoben Seitenketten von Leucin, Valin und Prolin auf der einen Seite des gewellten Ringes, die Seitenketten vom Phenylalanin liegen in der Ringebene, während die hydrophilen Ornithin-Seitenketten auf der anderen Ringseite liegen. Gramicidin S entspricht also in seinem prinzipiellen Aufbau einem kationischen Detergens mit



6 49

Abbildung 3 Konformation von Gramicidin S (6) und Retrogramicidin S (51) [65] (Teilstruktur)

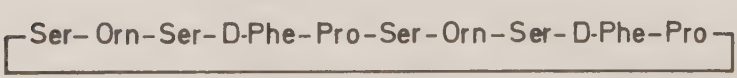
hydrophilem Kopf und hydrophobem Rest.

Izumiya und Mitarbeiter synthetisierten eine große Zahl von Gramicidin S-analogen Cyclodecapeptiden und prüften sie auf antibiotische Aktivität. Es fällt auf, daß alle Analogen, in denen Valin oder Leucin durch Glycin ersetzt sind, also [1.1'-Glycin]Gramicidin S [63], [3.3'-Glycin]Gramicidin S [67] und [1.1'.5.5'-Glycin]Gramicidin S [60] völlig unwirksam sind. Dagegen besitzen [1.1'-Alanin]Gramicidin S [63] und [3.3'-Alanin]Gramicidin S [68] 100 % bzw. 10 % der Wirksamkeit von Gramicidin S. Das [4.4'-Glycin]Gramicidin S [62], in dem D-Phenylalanin gegen Glycin ausgetauscht ist, besitzt nur noch 10 % der Wirksamkeit gegen Bac. subtilis und ist gegen Staph. aureus unwirksam. Alle diese Befunde stehen im Einklang mit dem

postulierten Wirkungsmechanismus des Gramicidin S.

Beim Retrogramicidin S (51) [65], dem Cyclodiastereomeren [98] des Gramicidin S (6), von dem in Abbildung 3 die wahrscheinliche Konformation gezeigt ist, liegen die hydrophoben Prolin-Reste auf der gleichen Seite der Ringebene wie die Ornithin-Seitenketten. Diese ungünstigere Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Bereiche erklärt die auf ein Zehntel herabgesetzte antibiotische Aktivität von 51 gegenüber 6.

Ein weiterer Beweis für den vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus von Gramicidin S (6) als kationisches Detergens ist die antibiotische Unwirksamkeit des Cyclodecapeptids 52, das von Okawa und Mitarbeitern [72] synthetisiert wurde.



52

Setzt man voraus, daß 52 - durch die Sequenz -D-Phe-Pro- gezwungen - in der gleichen antiparallelen ß-Faltblattstruktur vorliegt wie Gramicidin S, dann würden sich an Stelle der den Ornithin-Resten gegenüberliegenden hydrophoben Seitenketten von Valin und Leucin nun in Verbindung 52 hydrophile Serin-Reste befinden. Damit wäre eine Detergentien-ähnliche Struktur und Wirkung ausgeschlossen.

Überraschend ist die volle antibiotische Wirksamkeit des [5-Glycin]Gramicidin S [71], des [5.5'-Glycin]Gramicidin S [57,58] und seines von Shemyakin und Mitarbeitern [99] synthetisierten

Cycloenantiomeren [98] retroenantio[5.5'-Glycin]Gramicidin S. Diese Cyclodecapeptide liegen aber wahrscheinlich in einer anderen Konformation vor, da die stabilisierenden Prolin-Reste fortgefallen sind [58].

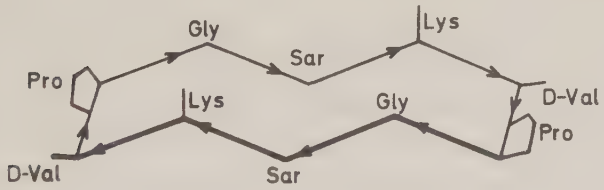


Abbildung 4 Gramicidin S-analoge Konformation des Cyclodecapeptid-dihydrochlorids 50

Überträgt man nun die antiparallele ß-Faltblattstruktur auf das neu synthetisierte Cyclodecapeptid 50 und setzt voraus, daß der Abschnitt -D-Val-Pro- ebenfalls in der "Dachrinne" [78] liegt (Abbildung 4), so sieht man, daß 50 nicht als Detergens wirken kann:

1. Da in 50 vier Aminosäuren ohne Seitenkette vorliegen, kann das hydrophile Peptid-Rückgrat nicht durch hydrophobe Gruppen abgeschirmt werden, der Beitrag der N-Methylgruppe des Sarkosins ist vernachlässigbar klein.
2. Die Seitenkette der basischen Aminosäure (Lysin) steht auf der gleichen Seite wie der Prolin-Rest, da das Lysin in der Sequenz direkt vor der Sequenz -D-Val-Pro- liegt, während beim Gramicidin S (6) zwischen Ornithin und der

Sequenz -D-Phe-Pro- noch ein Leucin steht.

3. Die Seitenketten der beiden Valin-Reste bilden mit den anderen Alkylgruppen kein hydrophobes Zentrum, sondern ragen einander entgegengesetzt seitlich aus der Ringebene heraus.
4. Auch bei anderen Konformationen wäre die Gesamtzahl der hydrophoben Gruppen von 50 wahrscheinlich zu klein.

Wie sich aus dem NMR-Spektrum von 50 schließen läßt, liegt 50 in Lösung nicht in einer bevorzugten Konformation vor, denn alle Signale sind stark verbreitert, und die Signale der Amidprotonen zeigten nicht die signifikanten Änderungen beim Übergang von Tetradeuteromethanol zu Trifluoressigsäure als Lösungsmittel, wie sie beim Gramicidin S (6) und anderen Cyclopeptiden beobachtet wurden [78].

VI. Untersuchungen zur Cyclodimerisierung und Polymerisation bei der Cyclisierung des Pentapeptids 28

1. Cyclodimerisierung

Nachdem durch die Synthese des geschützten Cyclodecapeptids 49 Vergleichsmaterial zur Verfügung stand, sollte geprüft werden, ob bei der Cyclisierung von 28 eine bisher nicht beobachtete [35,36] Cyclodimerisierung in geringem Ausmaß eingetreten war. Bei der präparativen Schichtchromatographie der neutralen Inhaltsstoffe des Rohprodukts von 29 hatte man nämlich mehrere schwache Zonen mit kleinerem R_F-Wert als dem von 29 beobachtet. Die Aufarbeitung des Kieselgels zwischen Start und Hauptzone

lieferte nach erneuter Trennung auf Kieselgel mehrere Fraktionen, die man dünnschichtchromatographisch mit 29 und 49 sowie nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppen mit den freien Cyclopeptiden 5 und 50 chromatographisch und elektropherographisch verglich. Man konnte so feststellen, daß eine dieser Fraktionen aus einem ca. 2:1-Gemisch der Cyclopeptide 5 und 50 bestand. Daraus ließ sich das Produktverhältnis von Cyclopentapeptid zu Cyclodecapeptid als 60:1 abschätzen.

Besser gelingt die präparative Trennung der geschützten Cyclopeptide 29 und 49 durch Gelchromatographie an Sephadex LH 20 mit Methanol. Abbildung 5a zeigt das Elutionsdiagramm der Trennung einer Mischung von 60 mg 29 und 68 mg 49 an einer Säule 2.5 x 84 cm. Man sieht, daß das geschützte Cyclodecapeptid 49 deutlich getrennt vor dem geschützten Cyclopentapeptid 29 eluiert wird.

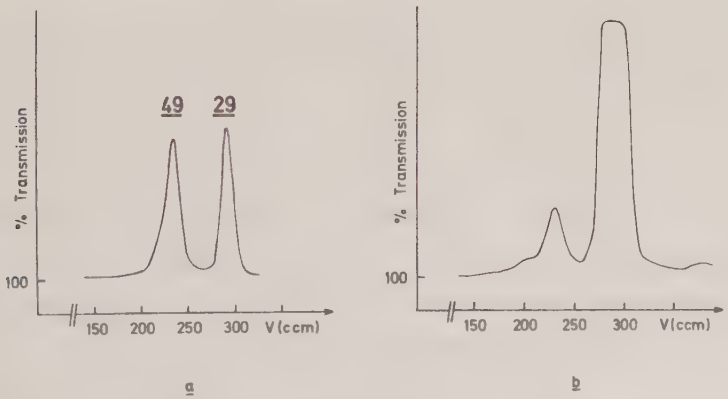


Abbildung 5 a) Trennung von 29 und 49 an Sephadex LH 20
b) Chromatographie des Cyclopeptids 29 von Brockmann und Graef [35,36] an Sephadex LH 20

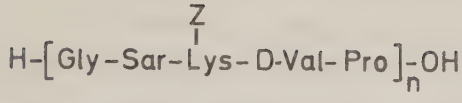
Daraufhin chromatographierte man eine 970 mg-Probe von 29, die von Brockmann und Graef [35,36] synthetisiert worden war, unter den gleichen Bedingungen. Wie das Elutionsdiagramm (Abbildung 5b) zeigt, wird vor der Hauptzone eine Substanz mit gleichem Elutionsvolumen wie dem von 49 eluiert. Der Inhaltsstoff dieser Zone stimmte auch dünnschichtchromatographisch mit 49 überein. Die Auswaage der beiden Fraktionen führte auch hier zu einem Produktverhältnis zwischen Cyclopentapeptid und Cyclodecapeptid von 60:1.

2. Lineare Polymere

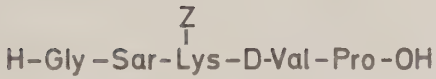
Zur chromatographischen Untersuchung des bei der Cyclisierung von 28 anfallenden Rohprodukts auf lineare Oligomere 53a mit n = 2 synthetisierte man zunächst die Modellverbindungen 54 (n = 1) und 55 (n = 2), um geeignete Chromatographiesysteme zur Trennung solcher Oligomere zu finden.

54a erhielt man aus dem aminogeschützten Pentapeptid 27 durch Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe mit 70 proz. wäßriger Trifluoressigsäure. Entsprechend wurde 55a aus 46 dargestellt. Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppen mit Palladium in salzsaurem Methanol führte zu 54b bzw. 55b. 54a, 54b, 55a und 55b waren nach Umfällen chromatographisch und elektropherographisch einheitlich und wurden durch Aminosäurebestimmung charakterisiert.

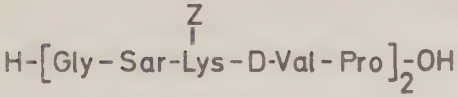
54a und 55a lassen sich dünnschichtchromatographisch mit n-Propanol/10 proz. Ammoniak (7:3) auf Kieselgel gut trennen, jedoch wandert das Decapeptid 55a schneller als das Pentapep-



53a
b: H·HCl statt Z



54a
b: H·HCl statt Z



55a
b: H·HCl statt Z

tid 54a, so daß für höhere Homologe R_F-Werte zu erwarten sind, die sich nicht sicher von denen anderer Reaktionsprodukte unterscheiden.

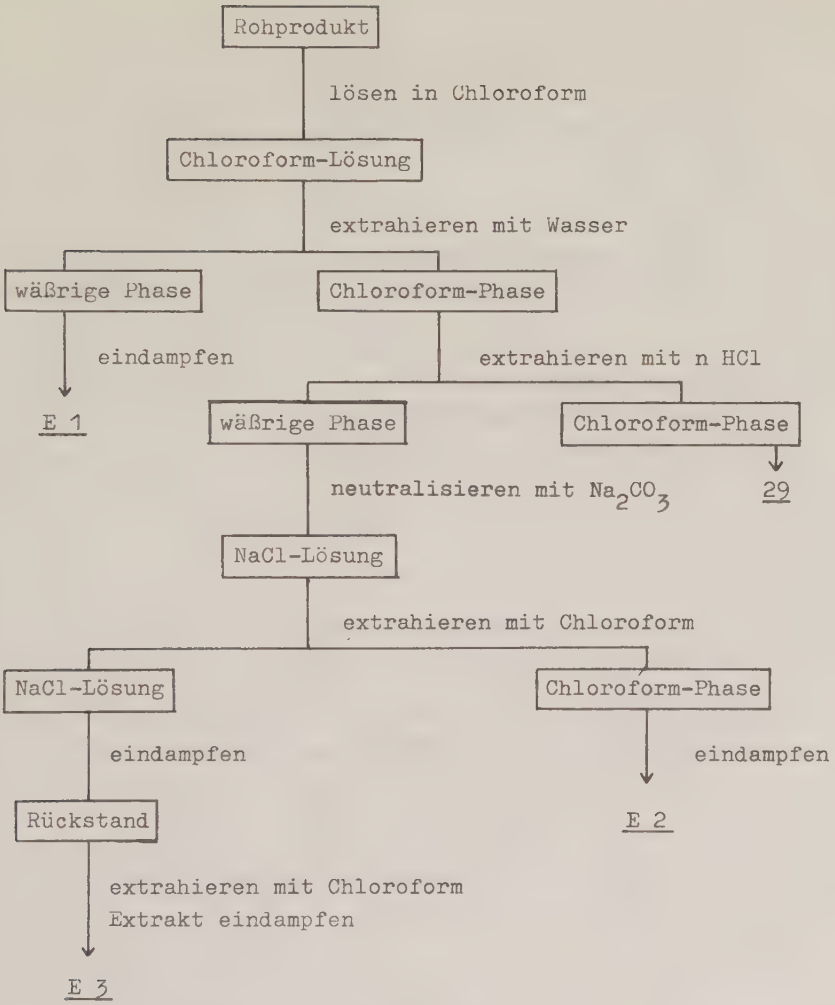
Es zeigte sich schließlich, daß die beste chromatographische Trennung bei 54b und 55b durch mehrfache Entwicklung mit dem System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) - das man zunächst wegen zu kleiner R_F-Werte verworfen hatte - im Ringchromatogramm auf Papier zu erzielen war. Das kleinere Peptid 54b mit der niedrigeren Molmasse hatte erwartungsgemäß [100] den größeren R_F-Wert, höhere Oligomere sollten also noch näher am Start bleiben als 55b.

Die Verbindungen 54a und b sowie 55a und b sind Ninhydrin-positiv, jedoch ist die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion bei den Decapeptiden 55a und b auch bei Verwendung von 3 proz. Ninhydrin-Lösung unbefriedigend. Ähnlich schlechte Farbausbeuten sind auch von anderen höheren Peptiden bekannt [100].

Bei höheren Oligomeren 53 mit n > 2 war mit einer noch schlechteren Reaktion zu rechnen. Da diese - wenn überhaupt - nur in geringer Menge in dem Rohprodukt zu erwarten waren, wurde als Nachweisreaktion die Umsetzung mit Chlor und o-Tolidin nach Reindel und Hoppe [101,102] erprobt. Hiermit liegt die Nachweisgrenze für 53b bei 1 Mikrogramm bei einem Fleckdurchmesser von 1 cm.

Zur Untersuchung auf Oligomere zog man das Rohprodukt der Cyclisierung von 28 und die bei der Reinigung angefallenen Extrakte heran (siehe Schema 4).

Die Extrakte E 1, E 2, E 3 und eine Probe des Rohprodukts hydrierte man mit Palladium in salzsaurem Methanol und untersuchte sie papierchromatographisch mit 54b, 55b und dem Cyclopentapeptid-hydrochlorid 5 als Vergleichssubstanzen. Als Produkt einer linearen Kondensation konnte jedoch lediglich das Dimere 55b in E 1 nachgewiesen werden. Bei der hohen Verdünnung während der Cyclisierung wäre demnach die Wahrscheinlichkeit der Reaktion von einem in geringer Konzentration vorliegenden Dimeren 55a mit einem weiteren Pentapeptidmolekül 28 sehr gering. Hierbei ist vorausgesetzt, daß das chromatographische Verhalten und die Löslichkeit der höheren Oligomeren den aus 54 und 55 abgeleiteten Erwartungen entspricht.



Schema 4 Abtrennung von Nebenprodukten der Cyclisierung von 28

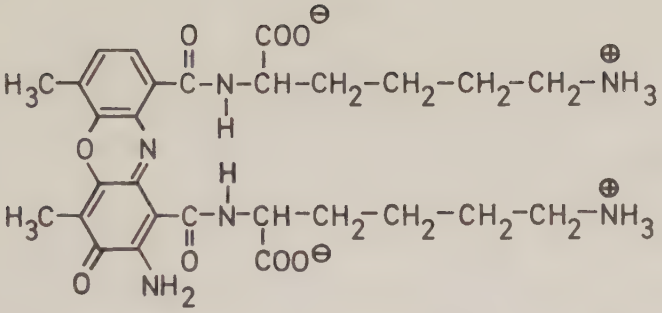
VII. Synthese von Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) und Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62)

1. Vorbemerkungen

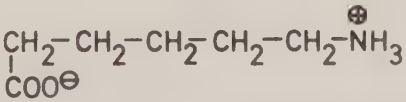
Die Synthese der beiden isomeren symmetrischen Actinocinyl-bis-lysine 58 und 62 wurde in Angriff genommen, um die Wasserlöslichkeit dieser ionischen Actinocin-Derivate zu untersuchen. Wegen des unterschiedlichen Abstandes der Amino- und Carboxylgruppen - bei 58 5 C-Atome, bei 62 1 C-Atom - sollte sich bei 58 eine stärkere Solvatisierung und damit, unter der Voraussetzung gleicher Gitterenergie, eine bessere Wasserlöslichkeit erwarten lassen.

Solche Unterschiede in der Wasserlöslichkeit zeigen z.B. die beiden isomeren Aminohexansäuren 6-Amino-capronsäure (63) und Norleucin (64). Dunn und Mitarbeiter [103] bestimmten die Löslichkeit von D.L-Norleucin (64) in Wasser bei 25° zu 1.18 g / 100 ccm, während McMeekin und Mitarbeiter [104] für 6-Amino-capronsäure (63) ebenfalls bei 25° eine Löslichkeit von 50.63 g / 100 ccm Wasser fanden. Die 58-ähnliche 6-Amino-capronsäure, bei der zwischen Amino- und Carboxylgruppe 5 Methylengruppen stehen, ist also mehr als 40fach besser wasserlöslich als D.L-Norleucin (64), in dem wie bei 62 Amino- und Carboxylgruppe eng benachbart stehen.

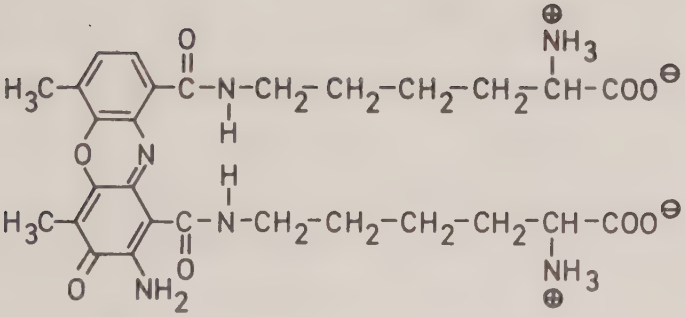
58 und 62 sollten außerdem auf Komplexbildung mit DNS und auf biologische Wirksamkeit untersucht werden.



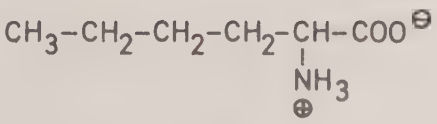
58



63



62



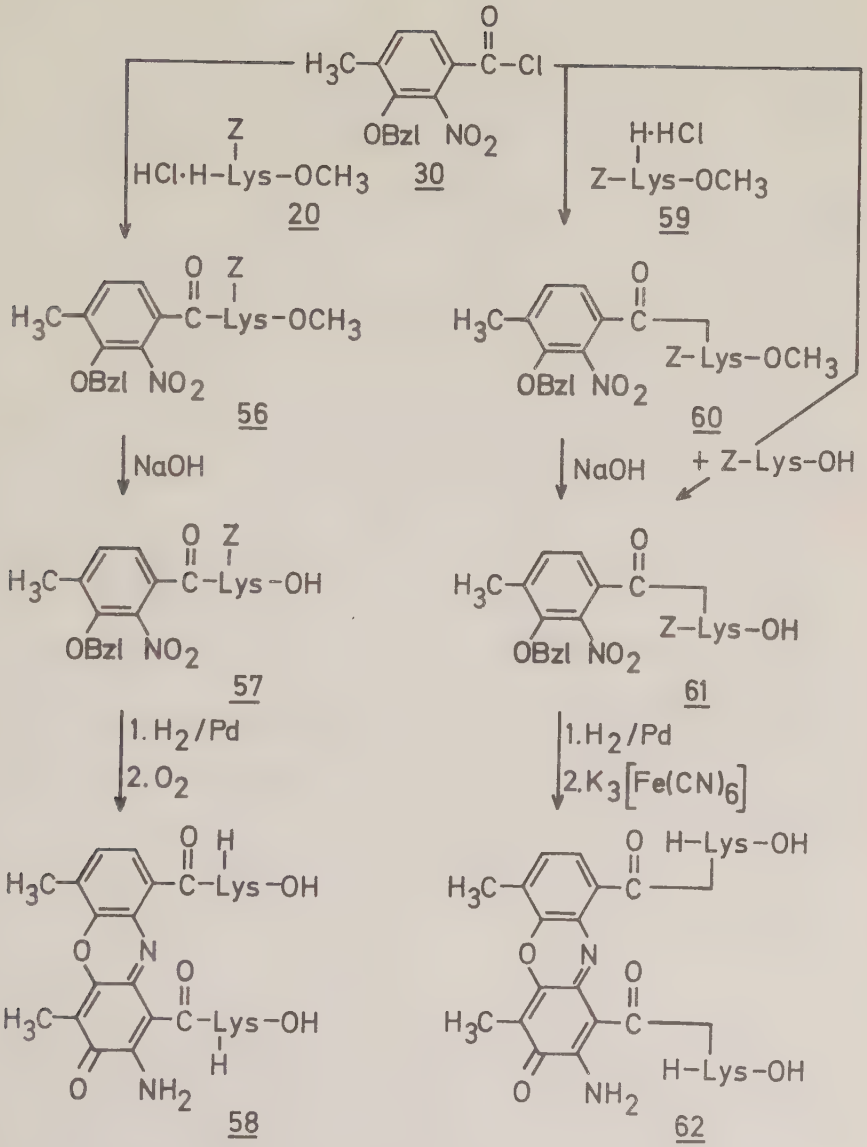
64

2. Synthese des Actinocinyl-bis-N^{α}.$N^{\alpha'}$-L-lysin (58) (Schema 5)

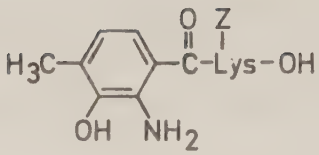
Aus N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid (20) erhielt man mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid (30) in Methylenchlorid/Triäthylamin das Lysinderivat 56, das nach Filtration über Aluminiumoxid aus Äthylacetat/Cyclohexan umgefällt als schwach gelber, amorpher Feststoff in 89 proz. Ausbeute anfiel. Das dünnschichtchromatographisch einheitliche Produkt wurde durch Elementaranalyse und NMR-Spektrum charakterisiert.

Die Verseifung von 56 mit wäßrigem Natriumhydroxid in Methanol ergab die Säure 57 nach Umfällen aus Äthylacetat/n-Hexan als farbloses Pulver in 78 proz. Ausbeute. Um zu prüfen, ob bei der alkalischen Hydrolyse Racemisierung eingetreten war, wurde eine Probe von 57 mit Diazomethan in Methanol wieder verestert. Die spezifische Drehung des hierbei erhaltenen 56 stimmte innerhalb der Meßgenauigkeit mit der von unbehandeltem 56 überein.

Um sicher zu gehen, daß bei der Hydrogenolyse von 57 mit Palladium in Methanol auch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe quantitativ abgespalten wird, untersuchte man den Ablauf der Hydrierung dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Beim Zusatz von Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) (20 % bezogen auf eingesetztes 57) und Palladium-Mohr (10 % bezogen auf 57) war bereits nach 15 Min. nur eine, intensiv blau fluoreszierende Zone im Chromatogramm zu sehen, und es trat auch nach mehrstündigem Weiterhydrieren keine Veränderung mehr ein. Bei Zusatz von weniger Katalysator (Pd/A-Kohle, 10 % Pd, 10 % bezogen auf 57) trat intermediär



Schema 5 Synthese von Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) und Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62)



65a

b: H statt Z

eine zweite blau fluoreszierende Zone mit größerem R_F-Wert auf, die dem o-Aminophenol 65a zuzuordnen ist.

Die oxidative Kondensation von 65b zu 58 wurde nicht wie üblich mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in Phosphatpuffer pH 7.2 durchgeführt, denn ein Vorversuch hatte gezeigt, daß sich 58 nicht aus der Reaktionslösung extrahieren ließ. Eine Abtrennung der anorganischen Salze durch Gelchromatographie erschien wenig aussichtsreich. Daher wurde die Oxidation mit Sauerstoff in Methanol vorgenommen. Das Actinocin-Derivat 58 schied sich als mikrokristalliner Niederschlag in 65 proz. Ausbeute ab und wurde durch Analyse, UV-Spektrum und Farbreaktion mit wäßrigem Natriumhydroxid in Dimethylformamid charakterisiert.

3. Synthese von Actinocinyl-bis-N^{ε}.N^{ε}'-L-lysin (62) (Schema 5)

Für die Synthese des Lysinderivats 60 wurde zunächst das bisher nicht beschriebene N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid (59) dargestellt. 59 wurde aus N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Fa. Fluka) durch Veresterung mit Chlorsulfinsäure-methylester (Thionylchlorid-Methode von Brenner

und Huber [84]) als farbloser, stark hygroskopischer Schaum in 81 proz. Ausbeute erhalten. Das elektropherographisch und chromatographisch einheitliche Produkt lieferte eine befriedigende Elementaranalyse.

59 führte mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid (30) zum kristallinen Lysin-Derivat 60 mit Schmp. 114-115°. Alkalische Verseifung ergab 61, das aus Äthylacetat/Cyclohexan in schwach gelben Würfeln vom Schmp. 80-82° kristallisierte. 61 ließ sich auch durch Acylierung von N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin mit 30 nach Schotten-Baumann darstellen, jedoch war das Rohprodukt durch 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure verunreinigt, die sich nur durch langwierige Chromatographie an feinem Kieselgel abtrennen ließ.

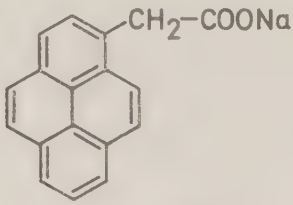
61 konnte nach Hydrierung mit Palladium in Methanol mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in gepufferter Lösung zum Actinocin-Derivat 62 umgesetzt werden, da 62 im Gegensatz zu 58 schlecht wasserlöslich ist und aus der Reaktionslösung in feinen, roten, zu Büscheln verwachsenen Nadeln ausfällt. 62 wurde durch Elementaranalyse und UV-Spektrum charakterisiert.

4. Eigenschaften der isomeren Actinocinyl-bis-L-lysine 58 und 62

Wie schon berichtet wurde, ist 58 sehr gut wasserlöslich, während 62 in Wasser völlig unlöslich ist. Aber auch in fast allen untersuchten organischen Lösungsmitteln ist 62 unlöslich, lediglich in Dimethylsulfoxid und Eisessig tritt eine schwache Färbung auf. Aus diesem Grund läßt sich kein quantitatives UV-Spektrum von 62 erhalten, da sich auch geringe Einwaagen nicht

völlig auflösen.

Salze polycyclischer Aromaten wie Natrium-pyrenyl-3-acetat (66), die als Lösungsvermittler die Löslichkeit der Actinomycine in Wasser stark erhöhen, vermögen keine nennenswerte Steigerung der Wasserlöslichkeit von 58 herbeizuführen. Eine gesättigte Lösung von 66 in Wasser wird durch 58 nur schwach angefärbt. Lediglich in starken Säuren ist 58 gut löslich.



66

Der erwartete Unterschied in der Wasserlöslichkeit von 58 und 62 kann jedoch nicht mit Sicherheit auf unterschiedliche Solvatisierung zurückgeführt werden, denn die unterschiedliche Löslichkeit könnte auch mit einer verschieden großen Gitterenergie erklärt werden.

Da die Schmelzpunkte beider Verbindungen nicht ermittelt werden können - 58 und 62 schmelzen nicht bis 320°, wobei ab 220° Schwarzfärbung eintritt - lassen sich Unterschiede in der Gitterenergie von 58 und 62 nicht abschätzen.

Das wasserlösliche Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) bildet keinen Komplex mit DNS und ist dementsprechend wie auch 62 im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das bereits von Brockmann und Graef [35,36] beschriebene Cyclopentapeptid cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (5) wurde dargestellt, wobei die Synthese in mehreren Schritten verbessert werden konnte.

2. Die Löslichkeit des geschützten Cyclopentapeptids cyclo-(N^{ε}-Benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (29) in Wasser und ihre Beeinflussung durch das gut wasserlösliche Hydrochlorid 5 der Cyclopentapeptidbase wurde bestimmt.

3. Aus dem Cyclopentapeptid 5 wurde mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure das Actinomycin-Lys-D-Val-Pro-Gly-Sar (33) synthetisiert. 33 bildet keinen Komplex mit DNS und ist antibiotisch unwirksam. Beide Befunde stehen im Einklang mit dem von Müller [31,32] entwickelten Modell des Actinomycin-DNS-Komplexes.

4. Das Actinomycin-Analoge 33 ist bemerkenswert gut wasserlöslich. Wegen Substanzmangels war eine Messung der Löslichkeit bei verschiedenen Temperaturen zur Bestimmung des Temperaturkoeffizienten der Löslichkeit in Wasser nicht möglich.

5. Das dem Gramicidin S ähnliche Cyclodecapeptid cyclo-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (50) wurde dargestellt und auf antibiotische Wirksamkeit unter-

sucht. Das Fehlen antibiotischer Aktivität bei 50 wird durch Vergleich mit Gramicidin S und anderen Cyclodecapeptiden erklärt.

6. Als Produkt der bisher nicht beobachteten Cyclodimerisierung bei der Cyclisierung des aktivierten Pentapeptids Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-p-nitrophenylester-trifluoracetat (28) wurde das Cyclodecapeptid cyclo-(N^{ε}-Benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (49) isoliert und dessen Konstitution durch Vergleich mit direkt synthetisiertem 49 sichergestellt.

7. Die freien Peptide Glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolin (54b) und Glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolin (55b) wurden dargestellt als Modellsubstanzen für bei der Cyclisierung des aktivierten Pentapeptids 28 entstehende lineare Oligomere.

8. Das bei der Cyclisierung von 28 erhaltene Rohprodukt und mehrere bei der Reinigung anfallende Fraktionen wurden auf lineare Oligomere untersucht. Das lineare Decapeptid 55b konnte papierchromatographisch nachgewiesen werden, höhere Oligomere wurden jedoch nicht gefunden.

9. Actinocinyl-bis-$N^{\alpha}.N^{\alpha'}$-L-lysin (58) und Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62) wurden synthetisiert und ihre Löslichkeit in Wasser untersucht. Es zeigten sich die erwarteten Unterschiede. 58 und 62 sind antibiotisch unwirksam.

IX. Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte wurden im Berl-Block bestimmt und sind korrigiert

Spektren: Die abgebildeten oder erwähnten Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

Elektronenspektren: Beckman DB-GT
Zeiss DMR 21

IR-Spektren: Perkin-Elmer Mod. 21, KBr-Preßlinge

NMR-Spektren: Varian A 60 (60 MHz)
Varian HA 100 (100 MHz)
Tetramethylsilan als innerer Standard.
Im Text chemische Verschiebungen in -Werten,
s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett,
q = Quadruplett, m = Multiplett.

Drehwerte wurden im Polarimeter Perkin-Elmer 141 bestimmt.

Chromatographie:

Kieselgel unter 0.08 mm, Kieselgel HF_{254} und Kieselgel PF_{254}: Fa. Merck, Darmstadt

Aluminiumoxid wurde von Fa. Woelm, Eschwege, bezogen.

Papierbögen Nr. 2043 b Mgl stammten von der Fa. Schleicher & Schüll, Einbeck.

Für die Säulenchromatographie wurde Cellulosepulver Ederol Nr. 222 der Fa. Binzer, Hatzfeld, verwendet.

Dünnschichtchromatographie führte man aus auf DC Mikrokarten SiF der Firma Riedel-De Haen, Seelze.

Präparative Schichtchromatographie: Für 10 Platten 20 x 40 cm schlämmte man 480 g Kieselgel PF_{254} mit 1.3 l Wasser auf und gab 150 ccm der entstandenen Suspension auf eine mit einem Rand

aus "Tesa-Krepp"-Klebeband (Fa. Beiersdorf, Hamburg) versehene Glasplatte 20 x 40 cm. Die lufttrockenen Platten wurden 2 Stdn. bei 140° aktiviert.

Hochspannungselektrophoresen führte man auf Papier Nr. 2040 b (Fa. Schleicher & Schüll) mit einer Apparatur der Fa. Camag, Berlin, in folgenden Puffersystemen durch:

Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (15:5:80) pH 2.0
Essigsäure/Pyridin/Wasser (10:1:89) pH 3.5
Essigsäure/Pyridin/Wasser (1:10:89) pH 6.0

Für die Aminosäureanalysen wurden ca. 0.2 µMol Substanz 24 Stdn. bei 110° mit 6 n HCl hydrolysiert und das Hydrolysat mit einem Beckman Unichrom Aminosäureanalysator untersucht.
Die angegebenen Werte sind Relativwerte.

Reagenzien:

Kalbsthymus-DNS stammte von Fa. Serva, Heidelberg.
BPES-Puffer: Man löst 14.24 g $Na_2HPO_4\ 2H_2O$, 3.12 g $NaH_2PO_4\ 2H_2O$, 10.52 g NaCl und 3.72 g Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz mit Wasser zu 1000 ccm und stellt auf pH 7.0 ein.
10 proz. Natrium-m-kresotinatlösung: 230 g Natriumhydroxid wurden in 8.9 l Wasser gelöst und die Lösung mit m-Kresotinsäure gesättigt (etwa pH 5.8)
Gebrauchsfertiges Ninhydrin-Sprühreagenz wurde von Fa. Merck bezogen. Für 3 proz. Ninhydrin-Lösung löste man 15 g Ninhydrin in 450 ccm n-Butanol, 5 ccm Eisessig und fügte 50 g Phenol zu.
Die Chlor-Tolidin-Reaktion nach Reindel und Hoppe [101] wurde bei Dünnschichtchromatogrammen in der Variante nach Barrollier [102] durchgeführt.

Isocyanatoessigsäure-äthylester

90 g (0.64 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid wurden in 300 ccm Toluol suspendiert und in der Siedehitze wurde 6 Stdn. Phosgen eingeleitet, bis sich eine klare Lösung gebildet hatte. Nun wurde i. Vak. über eine Vigreux-Kolonne zunächst das Toluol abdestilliert, dann ging bei 66-69° / 11 Torr der Isocyanatoessigsäure-äthylester über. Ausbeute 74 g (90 % d. Th.)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin (16)

74 g (0.57 Mol) Isocyanatoessigsäure-äthylester wurden mit 300 ccm tert.-Butanol und 75 ccm Pyridin 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 750 ccm Methanol gelöst und mit 575 ccm n NaOH über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Man dampfte i. Vak. ein, löste den Rückstand in Wasser und säuerte bei 0° mit Citronensäure bis pH 3 an. Das ausfallende Produkt wurde in Äther aufgenommen und die wäßrige Phase noch zweimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherlösungen wusch man mit wenig Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Der Rückstand wurde aus Äthylacetat umkristallisiert. Man erhielt 82 g 16 (81 %) als farblose Kristalle vom Schmp. 87-89°.

Sarkosinmethylester-hydrochlorid

Zu 90 ccm Methanol, das mit einem Kryomaten auf -25° gekühlt wurde, tropfte man innerhalb 30 Min. 23.7 ccm (0.33 Mol) frisch destilliertes Thionylchlorid unter Rühren so zu, daß die Temperatur nicht über -5° stieg. Dann fügte man unter

weiterer Kühlung 26.7 g (0.30 Mol) Sarkosin zu und erwärmte danach langsam auf 40°. Nach 2 Stdn. bei dieser Temperatur wurde die Lösung durch eine Glasfritte filtriert und i. Vak. eingedampft. Den kristallinen Rückstand trocknete man im Exsikkator über Kaliumhydroxid. Ausbeute quantitativ

Sarkosinmethylester (17)

Zu einer Lösung von 20 g (0.14 Mol) Sarkosinmethylester-hydrochlorid in 50 ccm Methanol gab man bei 0° 20.15 ccm frisch destilliertes Triäthylamin, fügte 800 ccm Äther zu und kühlte 1 Std. im Eis-Kochsalz-Bad. Dann filtrierte man und wusch das Triäthylammoniumchlorid mit Äther. Die vereinigten Filtrate wurden eingeengt und der Rückstand bei 20 Torr unter Stickstoff destilliert. Kp^{20}: 43-45°, n_D^{20}: 1.4152, Ausbeute 8.2 g (55 %)

D-Valinmethylester (23) und L-Prolinmethylester (26) wurden wie beim Sarkosinmethylester beschrieben über die Methylesterhydrochloride nach der Thionylchlorid-Methode und Freisetzung der Ester mit Triäthylamin gewonnen. Ausbeute an destilliertem Ester 75 bzw. 69 %.

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester-hydrochlorid (20)

Syntheseweg I

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin [105-107]: 9.0 g (49 mMol) L-Lysinmonohydrochlorid löste man in 100 ccm Wasser und fügte in der Siedehitze im Überschuß basisches Kupfercarbonat zu. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und das Filtrat mit 25 ccm 2 n NaOH versetzt. Nun fügte man unter Eiskühlung innerhalb 3 Stdn.

10 ccm Chlorameisensäure-benzylester und 50 ccm 2 n NaOH in 20 Portionen hinzu, wobei die Reaktionsmischung mit einem Vibromischer intensiv durchmischt wurde. Der Kupferkomplex, der sich als blauer Niederschlag abschied, wurde abgesaugt und sorgfältig mit Wasser und Äthanol gewaschen. Zur Abtrennung des Kupfers suspendierte man den Kupferkomplex in 350 ccm siedendem Wasser und versetzte mit 20 ccm Eisessig und 7.5 g Thioacetamid. Nachdem man 5 Min. gekocht hatte, filtrierte man rasch durch einen großen, geheizten Büchnertrichter vom Kupfersulfid ab. Das Produkt begann sofort auszukristallisieren, nach einigen Stunden im Kühlschrank wurde es abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und i. Vak. über Kaliumhydroxid getrocknet. Ausbeute 9.5 g (68 % d. Th.), Schmp. 250-252° (Zers.)

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester-hydrochlorid: Zu 60 ccm Methanol gab man bei -10° unter Rühren 3.0 ccm (41 mMol) frisch destilliertes Thionylchlorid und danach 9.4 g (33.5 mMol) N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin. Darauf wurde die Mischung langsam auf 40° erwärmt und 2 Stdn. bei dieser Temperatur gehalten. Nun kühlte man wieder auf -10° ab, gab 1.0 ccm Thionylchlorid zu und erwärmte wieder 2 Stdn. auf 40°. Die Lösung wurde durch eine Glasfritte filtriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft und der Rückstand noch einmal mit 50 ccm Methanol abgedampft. Den gelblichen, öligen Rückstand trocknete man i. Vak. über konz. Schwefelsäure und Natriumhydroxid. Aus Äthanol/Äthylacetat (1:20) erhielt man 8.7 g (78 %) 20 als farblose Kristalle vom Schmp. 112-114°. $[\alpha]_D^{20}$: +16.2 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol) (Lit.[88]: +16.7 ± 0.5°). Papierchromatographisch und dünn-

schichtchromatographisch einheitlich im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) bzw. n-Propanol/25 proz. Ammoniak (7:3). Die Substanz war Ninhydrin-positiv und wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation.

Syntheseweg II [88]

N.N'-Di-benzyloxycarbonyl-L-lysin: Zu einer Lösung von 31.25 g (171 mMol) L-Lysin-monohydrochlorid in 85 ccm Wasser und 171 ccm 2 n NaOH gab man unter Kühlung mit einem Eis-Kochsalz-Bad innerhalb 1 Std. 213 ccm 4 n NaOH und 90 ccm Chlorameisensäure-benzylester gleichzeitig so zu, daß die Temperatur nicht über 0° anstieg und der pH nicht unter 10 fiel. Mit einem Vibromischer wurde hierbei kräftig durchmischt. Nach weiteren 15 Min. Vibromischen wurde mit 250 ccm eisgekühlter 2 n HCl auf pH 1.5 angesäuert, zweimal mit Äther extrahiert und die vereinigten Ätherlösungen mit n HCl und Wasser gewaschen. Nun extrahierte man einmal mit 500 ccm und zweimal mit 125 ccm n Ammoniaklösung, wusch die ammoniakalische Lösung zweimal mit Äther, säuerte bei 0° in Gegenwart von 125 g Eis und 500 ccm Äther mit 175 ccm 4 n HCl an, trennte die Ätherphase ab und extrahierte noch zweimal mit je 100 ccm Äther. Die vereinigten Ätherlösungen wurden wiederum einmal mit 500 ccm und zweimal mit 100 ccm n Ammoniaklösung extrahiert, die ammoniakalische Lösung zweimal mit Äther gewaschen und dann unter gutem Rühren bei 0° in Gegenwart von 500 ccm Äther mit 175 ccm 4 n HCl angesäuert. Die Ätherschicht wurde abgetrennt und die wäßrige Phase zweimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten ätherischen Lösungen trocknete man über Natriumsulfat, zog den Äther i.

Vak. ab, dampfte den Rückstand noch zweimal mit Toluol ab und trocknete dann im Ölpumpenvakuum. Aus Äther/Petroläther erhielt man 52 g (74 %) farblose Kristalle vom Schmp. 80°.

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester-hydrochlorid (20):
Zu einer Lösung von 52 g (125 mMol) N.N'-Di-benzyloxycarbonyl-L-lysin in 315 ccm trockenem Äther gab man bei -10° innerhalb von 30 Min. 23 ccm frisch destilliertes Thionylchlorid. Nach 30 Min. bei Raumtemperatur erhitzte man 3 Stdn. unter Rückfluß, kühlte auf 10° und gab 300 ccm trockenes Methanol zu. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde i. Vak. eingedampft, dreimal mit je 50 ccm Methanol abgedampft, der ölige Rückstand in 50 ccm Methanol bei 50° gelöst und mit 500 ccm trockenem Äther versetzt. Der kristalline Niederschlag wurde noch einmal aus Methanol/Äther umkristallisiert. Man erhielt 35 g (85 %) 20 als farblose Kristalle vom Schmp. 114-116°.
$[\alpha]_D^{21}$: +16.0 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol)
Chromatographisch und elektropherographisch einheitlich und identisch mit dem nach I (Seite 57) erhaltenen Produkt.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosin-methylester (18)
Zu einer auf -10° gekühlten Lösung von 12.8 g (73 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin (16) in 35 ccm abs. Tetrahydrofuran (THF) gab man 7.5 g (73 mMol) frisch destillierten Sarkosin-methylester (17) und danach eine Lösung von 16.5 g (80 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) in 10 ccm abs. THF. Nach 24 Stdn. bei 0° versetzte man die Reaktionslösung mit 1.0 ccm Eisessig, saugte vom Dicyclohexylharnstoff ab und dampfte das Filtrat ein. Den Rückstand löste man in Chloroform

und schüttelte je zweimal mit 10 proz. Essigsäure, danach vorsichtig mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat dampfte man ein und kristallisierte den öligen Rückstand aus Cyclohexan. Man erhielt 13.74 g (73 %) 18 als farblose Prismen vom Schmp. 70-72°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Aceton (9:1).

$C_{11}H_{20}N_2O_5$ (260.3)	Ber.	C 50.75	H 7.74	N 10.77
	Gef.+	C 51.06	H 7.75	N 10.92

+ 5 Stdn. bei 40° im Hochvak. getrocknet

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosin (19)

Zu einer Lösung von 13.58 g (52.2 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosin-methylester (18) in 17 ccm Aceton gab man 26.5 ccm 2 n NaOH und schüttelte 1 Std. bei Raumtemperatur. Dann verdünnte man mit Wasser, saugte von den ausgefallenen Kristallen ab und wusch die Lösung dreimal mit Chloroform. Die wäßrige Phase säuerte man mit 10.6 ccm 5 n HCl an, nahm das ausfallende Öl in Chloroform auf und extrahierte erschöpfend mit Chloroform. Die vereinigten Chloroform-Lösungen wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man erhielt 11.42 g (89 %) 19 als zähes, farbloses Öl.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysin-methylester (21)

Zu einer Lösung von 15.3 g (46.3 mMol) N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-

L-lysin-methylester-hydrochlorid (20) in 150 ccm Methylenchlorid gab man unter Eiskühlung 6.5 ccm (46.3 mMol) Triäthylamin und saugte nach 5 Min. das Triäthylammoniumchlorid ab. Das Filtrat kühlte man auf -10° und fügte eine Lösung von 11.42 g (46.3 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosin (19) in 20 ccm abs. THF zu. Nach 15 Stdn. bei 0° saugte man vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein und löste den Rückstand in Aceton. Um überschüssiges DCCI zu zerstören, gab man 1 ccm 50 proz. Essigsäure zu, ließ noch 2 Stdn. im Kühlschrank stehen und filtrierte dann. Das Filtrat dampfte man i. Vak. ein, löste den Rückstand in Chloroform und schüttelte je zweimal mit 10 proz. Essigsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat dampfte man i. Vak. ein und erhielt das geschützte Tripeptid 21 als schwach gelbes Öl, das sich schlecht von Lösungsmittelresten befreien ließ. Das Produkt war dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Methanol (95:5).

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysin (22)

Man löste das oben erhaltene geschützte Tripeptid 21 in 20 ccm Aceton, gab 24 ccm 2 n NaOH zu und schüttelte 1 Std. bei Raumtemperatur. Dann verdünnte man mit Wasser, filtrierte, wusch das Filtrat dreimal mit Chloroform und säuerte dann mit 24 ccm 2 n HCl an. Das ausgefallene Öl wurde in Chloroform aufgenommen und die wäßrige Phase noch dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Lösungen wusch man zweimal

mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Das aminogeschützte Tripeptid 22 erstarrte zu einem farblosen, trockenen Schaum, der im System n-Propanol/Wasser (64:36) dünnschichtchromatographisch einheitlich war. $[\alpha]_D^{20}$: 0° (c = 2.6, Äthanol) (Lit.[35]: -1.3°, c = 2.6, Äthanol)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valin-methylester (24)

Zu einer Lösung von 21.40 g (42.1 mMol) des aminogeschützten Tripeptids 22 in 40 ccm abs. THF gab man bei -10° 5.52 g (42.1 mMol) frisch destillierten D-Valinmethylester (23) und danach eine Lösung von 9.59 g (46.5 mMol) DCCI in 10 ccm abs. THF. Nach 15 Stdn. bei 0° filtrierte man, dampfte das Filtrat ein, löste den Rückstand in Aceton und versetzte mit 1 ccm 50 proz. Essigsäure. Nach 2 Stdn. bei 0° filtrierte man, dampfte das Filtrat ein und löste den Rückstand in Chloroform. Die Lösung schüttelte man je zweimal mit 10 proz. Essigsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 25.9 g (99 %) 24 als farblosen, trockenen Schaum, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Methanol (9:1).

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valin (25)

Zu einer Lösung von 17.2 g (27.7 mMol) des geschützten Tetrapeptids 24 in 15 ccm Aceton gab man 7.5 ccm 4 n NaOH, schüttelte

15 Min. bei Raumtemperatur und ließ dann noch 45 Min. stehen. Dann verdünnte man mit Wasser, filtrierte, extrahierte das Filtrat mit Chloroform (Emulsionsbildung) und zentrifugierte. Die wäßrige Phase wurde mit 6 ccm 5 n HCl angesäuert, das ausgefallene Öl in Chloroform aufgenommen und die wäßrige Lösung noch dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Lösungen wusch man mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 15.0 g (89 %) des aminogeschützten Tetrapeptids 25 als farblosen, trockenen Schaum, den man pulverisierte. $[\alpha]_D^{21}$: -19.8 ± 0.5° (c = 3.3, Äthanol) (Lit.[35]: -19.8°, c = 3.3, Äthanol)

$C_{29}H_{45}N_5O_9$ (607.7)	Ber.	C 57.31	H 7.46	N 11.52
	Gef.+	C 57.18	H 7.48	N 11.62

+ 15 Stdn. bei 35° im Hochvak. getrocknet

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-methylester (15)

Zu einer Lösung von 14.79 g (24.4 mMol) des aminogeschützten Tetrapeptids 25 in 35 ccm abs. THF gab man bei -10° 3.15 g (24.4 mMol) frisch destillierten L-Prolinmethylester (26) sowie eine Lösung von 5.57 g (27.0 mMol) DCCI in 10 ccm abs. THF. Nach 15 Stdn. bei 0° saugte man vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein, löste den Rückstand in Aceton und versetzte mit 1 ccm 50 proz. Essigsäure. Nach 2 Stdn. bei 0° filtrierte man, dampfte das Filtrat i. Vak. ein, löste den Rückstand in Chloroform und schüttelte je zweimal mit 10 proz. Essigsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und

Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abziehen des Chloroforms erhielt man 17.5 g (99 %) 15 als schwach gelben, pulverisierbaren Schaum, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Methanol (9:1).

N-tert.-Butyloxycarboryl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (27)

Zu einer Lösung von 10.78 g (15.0 mMol) des geschützten Pentapeptids 15 in 12 ccm Aceton gab man 8 ccm 2 n NaOH und schüttelte 15 Min. bei 30°. Danach ließ man unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur stehen, verdünnte mit Wasser, filtrierte und extrahierte die Lösung mit Chloroform. Zur Trennung der Phasen zentrifugierte man, extrahierte die Chloroform-Phase nochmals mit Wasser und säuerte dann die vereinigten wäßrigen Phasen mit Citronensäure auf pH 3 an. Das ausfallende Öl nahm man in Chloroform auf und extrahierte noch dreimal mit Chloroform. Der Extrakt wurde mit angesäuertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man erhielt 10.13 g (96 %) des aminogeschützten Pentapeptids 27 als farblosen, spröden Schaum, dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1), Chloroform/Methanol/Eisessig (152:8:5) und n-Propanol/25 proz. Ammoniak (7:3). $[\alpha]_D^{20}$: -26.4 ± 0.5° (c = 3.3, Äthanol) (Lit.[35]: -27.4, c = 3.3, Äthanol)

$C_{34}H_{52}N_6O_{10}$ (704.8)	Ber.	C 57.94	H 7.44	N 11.93
	Gef.+	C 57.75	H 7.34	N 11.97

+ 18 Stdn. bei 35° im Hochvak. getrocknet

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-p-nitrophenylester (14)

Zu einer Lösung von 14.31 g (20.35 mMol) des aminogeschützten Pentapeptids 27 in 30 ccm abs. THF gab man bei -10° 2.83 g (20.35 mMol) p-Nitrophenol und danach eine Lösung von 4.75 g (23.0 mMol) DCCI in 6 ccm abs. THF. Man ließ 20 Stdn. bei 0° stehen, saugte vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein und löste den Rückstand in Chloroform. Die Chloroform-Lösung schüttelte man zweimal mit 10 proz. Essigsäure, einmal mit Wasser, dreimal mit 3 proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat verdampfte man das Chloroform i. Vak. und löste den Rückstand in Aceton. Nach einigen Stdn. bei 0° filtrierte man und dampfte ein, wobei man 16.0 g (95 %) des aminogeschützten Pentapeptid-p-nitrophenylesters 14 als schwach gelben, trockenen Schaum erhielt. Dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Benzol/Methanol (9:1). $[\alpha]_D^{17}$: -10.4 ± 0.5° (c = 2.5, Äthanol) (Lit.[35]: -13.1°).
p-Nitrophenylester-Gehalt nach [89]: 100 %; bei einer Probe nach Verreiben mit Äther: 97 %.

Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-p-nitrophenylester-trifluoracetat (28)

Zu einer Lösung von 5.00 g (6.06 mMol) des aminogeschützten Pentapeptid-p-nitrophenylesters 14 in 6 ccm Anisol gab man bei 0° 40 ccm Trifluoressigsäure, wobei starke Gasentwicklung eintrat. Nach 45 Min. bei 0° wurde die Lösung i. Vak. bei 30°

Badtemperatur eingedampft und der ölige Rückstand mehrfach mit Äther/Petroläther (1:1) verrieben. Man erhielt so 4.77 g (94 %) 28 als farbloses, trockenes Pulver, Ninhydrin-positiv und einheitlich im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) als Kation. p-Nitrophenylester-Gehalt: 78 %.

cyclo-(N^{ε}-Benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (29)

4.20 g (5.0 mMol) Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-p-nitrophenylester-trifluoracetat (28) löste man in einer Mischung aus 100 ccm Dimethylformamid und 3 ccm Eisessig. Innerhalb 8 Stdn. tropfte man diese Lösung mit Hilfe eines Dosiertrichters (Fa. Normag) unter Rühren in 3.2 L Pyridin von 60° ein. Anschließend rührte man noch 1 Std. bei 60°. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur dampfte man i. Vak. ein und trocknete den Rückstand im Ölpumpenvakuum über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid. Das Rohprodukt löste man in Chloroform, extrahierte mit Wasser, zweimal mit n HCl, viermal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 2.7 g eines gelblichen, Ninhydrin-negativen Schaums. Zur weiteren Reinigung löste man in Chloroform, gab die Lösung auf eine Säule 5.5 x 10 cm aus basischem Aluminiumoxid Aktivitätsstufe I, wusch mit Chloroform und Äthylacetat und eluierte dann mit Methanol. Im Dünnschichtchromatogramm des Methanol-Eluats (2.5 g) (Äthylacetat/Methanol 2:1) fanden sich neben der Hauptzone mit R_F 0.5 noch 3 schneller laufende Zonen. Zur Abtrennung löste man das Rohprodukt in Äthylacetat und trug die

Lösung auf 4 präparative Platten 20 x 40 cm aus Kieselgel PF_{254} auf und entwickelte mit Äthylacetat/Methanol (3:1). Die Hauptzone wurde ausgeschabt, mit Methanol eluiert, eingedampft und die Lösung des Rückstandes in Chloroform mit Wasser ausgeschüttelt. Die filtrierte Chloroform-Phase trocknete man und dampfte i. Vak. ein. Die Chromatographie wurde noch einmal mit 2 Platten 20 x 40 cm unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Nach Umfällen aus Chloroform/n-Hexan erhielt man 1.56 g (59 %) des geschützten Cyclopentapeptids 29 als farbloses Pulver, das zwischen 83 und 95° schmolz. Bei der Chromatographie einer Probe über Sephadex LH 20 (Säule 2.5 x 84 cm) mit Methanol zeigte sich im Elutionsdiagramm nur eine, symmetrische Zone. Hierbei wurde als Detektor ein UV-Durchflußphotometer "Uvicord" bei 254 nm verwendet. Die Substanz war ebenfalls einheitlich im Dünnschichtchromatogramm (s. o.). $[\alpha]_D^{20}$: -29.4 ± 0.5° (c = 2.0, Äthanol) (Lit.[35]: -35.2°, c = 1.9, Äthanol).

$C_{29}H_{42}N_6O_7$ (586.7)	Ber.	C 59.37	H 7.21	N 14.33
	Gef.+	C 59.11	H 7.26	N 14.18

+ 14 Stdn. bei 55° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0

Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

cyclo-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (5)

1.90 g (3.24 mMol) des geschützten Cyclopentapeptids 29 löste man in 250 ccm Methanol, fügte 3.5 ccm n HCl hinzu und hydrierte 7 Stdn. mit 800 mg Palladium/A-Kohle (10 % Pd) und 400 mg Palladium-Mohr, wobei man zwischendurch zweimal mit frischem Wasserstoff beschickte. Nach Abfiltrieren des Katalysators dampfte man i. Vak. ein, trocknete zunächst i. Vak. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid und fällte dann aus Methanol/abs. Äther um. Man erhielt so 1.36 g (86 %) 5 als farbloses Pulver mit Schmelzbereich 185-195°. Das Produkt war einheitlich im Papierchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:1) und im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer). $[\alpha]_D^{20}$: -38.8 ± 0.5° (c = 2.5, Äthanol) (Lit.[35]: -41.2°, c = 2.4, Äthanol).

$C_{21}H_{37}ClN_6O_5$ (489.0)	Ber.	C 51.58	H 7.63	Cl 7.25	N 17.19
	Gef.+	C 50.86	H 7.75	Cl 8.00	N 17.04

+ 19 Stdn. bei 90° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.1	1.0	1.2	1.0	0.9

Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

cyclo-(N^{ε}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (31)

Zu einer Lösung von 880 mg (1.8 mMol) 5 in 75 ccm Methylen-

chlorid fügte man unter Eiskühlung 1.0 ccm N-Äthylmorpholin. Unter weiterem Kühlen und Rühren tropfte man nun die Lösung des kristallisierten 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-chlorids (30) in 40 ccm Methylenchlorid zu, das man aus 532 mg (1.85 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure mit Thionylchlorid erhalten hatte. Nach 14 Stdn. bei Raumtemperatur schüttelte man mit n HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Den Eindampfrückstand löste man in Chloroform, trug die Lösung auf 3 präparative Platten 20 x 40 cm auf und entwickelte dreimal mit Äthylacetat/Methanol (3:1). Das aus der Hauptzone isolierte Material fällte man um aus Chloroform/n-Pentan und erhielt so 995 mg (77 %) 31 als farbloses Pulver, das zwischen 110 und 125° schmolz. Dünnschichtchromatographisch rein im System Äthylacetat/Methanol (2:1). $[\alpha]_D^{20}$: -26.1 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol).

$C_{36}H_{47}N_7O_9$ (721.8) Ber. C 59.90 H 6.56 N 13.59

Gef.+ C 59.56 H 6.70 N 13.56

+ 5 Stdn. bei 75° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	0.7	1.1	1.1	1.1	0.8

NMR: Siehe Abbildung 1 (Seite 25)

Actinocinyl-bis-$N^{\varepsilon}.N^{\varepsilon}$'-cyclo-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (33)

1155 mg (1.6 mMol) 31 löste man in 100 ccm Methanol, hydrierte 3 Stdn. mit 120 mg Palladium/A-Kohle (10 % Pd) und 60 mg

Palladium-Mohr und saugte vom Katalysator ab.

Das cyclo-(N^{ε}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (32) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:1) eine blau fluoreszierende Zone mit R_F = 0.67. UV (Methanol): λ_{max} 323 nm

Zu der vom Katalysator abfiltrierten Lösung des cyclo-(N^{ε}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (32) gab man 90 ccm Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7.2 und fügte portionsweise eine Lösung von 1.75 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 30 ccm Puffer zu. Mit n NaOH wurde der pH bei 7.2 gehalten. Nach 2 Stdn. verdünnte man die rote Lösung mit 500 ccm Wasser und extrahierte erschöpfend mit Chloroform. Den Extrakt wusch man mit wenig Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Zur Reinigung chromatographierte man das Rohprodukt an einer Cellulosesäule 7.5 x 90 cm im System n-Butanol/n-Butylacetat/5 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat-Lösung (1:1:2). Man schnitt die Hauptzone heraus, eluierte mit Methanol und dampfte das Eluat i. Vak. ein. Den Rückstand löste man in Wasser, extrahierte mit Chloroform, wusch den Extrakt mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Den Rückstand (925 mg) löste man in Chloroform, adsorbierte an einer Säule 5 x 4 cm aus neutralem Aluminiumoxid IV, wusch mit Chloroform nach und eluierte dann mit Methanol. Den Eindampfrückstand des Eluats fällte man aus Chloroform/Cyclohexan um und erhielt so 748 mg (78 %) 33 als gelbrotes Pulver vom Schmp. 189-191°. Papierchromatographisch rein im System n-Butanol/n-

Butylacetat/5 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat-Lösung (1:1:2). $[\alpha]_D^{20}$: -38.6 ± 1.5° (c = 0.2, Methanol).

$C_{58}H_{80}N_{14}O_{14} \cdot 4\ H_2O$ (1269.5) Ber. C 54.87 H 6.99 N 15.45
Gef.+ C 54.85 H 7.00 N 15.63

+ 50 Stdn. bei 120° im Hochvak. getrocknet

UV (Methanol): λ_{max} 442 nm (ε = 26 400), 423 (24 900), 236 (41 000)

(Wasser): λ_{max} 448 nm (ε = 24 500), 432 (24 000), 236 (37 900)

Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

2-Aminobenzhydroxamsäure (43)

Zu einer Lösung von 34.8 g (0.5 Mol) Hydroxylammoniumchlorid in 50 ccm Wasser und 200 ccm 20 proz. wäßr. Natriumhydroxid gab man unter Rühren eine Lösung von 41.3 g (0.25 Mol) Anthranilsäure-äthylester (42) in 250 ccm Methanol. Es bildete sich zunächst eine Emulsion, die sich nach 2 Stdn. klärte. Nach 7 Tagen bei Raumtemperatur dampfte man i. Vak. Methanol und Äthanol ab, verdünnte mit wenig Wasser, filtrierte und säuerte mit ca. 70 ccm 6 n HCl auf pH 7.0 an (pH-Meter). Die ausgefallenen Kristalle saugte man nach einigen Stunden ab und wusch sie mit eiskaltem Wasser chloridfrei. Man erhielt 27.4 g (72 %) 43 als farblose Blättchen vom Schmp. 143°. Das Produkt ist dünnschichtchromatographisch rein im System Chloroform/Methanol (9:1). 43 gibt mit Eisen(III)-chlorid (Methanol) eine intensive rotviolette Färbung.

3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (40)

Zu einer Lösung von 4.6 g (30 mMol) 2-Aminobenzhydroxamsäure (43) in 140 ccm Wasser und 8 ccm konz. Salzsäure gab man bei 0° eine Lösung von 2.3 g (33 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser. Das Produkt schied sich sofort ab. Man saugte ab, wusch mit kaltem Wasser säurefrei, trocknete i. Vak. und kristallisierte aus Äthanol um. 4.15 g (85 %) farblose, verfilzte Nadeln vom Schmp. 184-185°. 40 gibt mit Eisen(III)-chlorid (Methanol) eine rote Färbung.

Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-methylester-hydrochlorid (44)

7.19 g (10 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-methylester (15) wurden mit 50 ccm 70 proz. wäßr. Trifluoressigsäure übergossen und 5 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann dampfte man i. Vak. bei 30° ein. Das zurückbleibende schwach gelbe Öl versetzte man mit 40 ccm Wasser, fügte unter Eiskühlung 8.5 g Natriumhydrogencarbonat zu und brachte mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 9. Man extrahierte dreimal mit Chloroform, wusch die vereinigten Extrakte zweimal mit Wasser und gab dann 5.0 ccm 2 n HCl zu. Man verdampfte i. Vak., dampfte noch zweimal mit Chloroform ab und trocknete i. Vak. über Kaliumhydroxid. Nach Umfällen aus Chloroform/Äther erhielt man 5.49 g (84 %) 44 als farbloses, trockenes Pulver, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Das Ninhydrin-positive Produkt wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheit-

lich als Kation. $[\alpha]_D^{20}$: -28.2 ± 0.5° (c = 1.4, Methanol)

$C_{30}H_{47}ClN_6O_8$ (655.2) Ber. C 54.99 H 7.23 Cl 5.41 N 12.83

Gef.+ C 55.06 H 7.43 Cl 5.20 N 12.73

+ 22 Stdn. bei 55° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.1	1.0	1.1	1.0	0.8

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-methylester (45)

In 15 ccm THF löste man 1.41 g (2.0 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (27), 1.31 g (2.0 mMol) Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin-methylester-hydrochlorid (44) und 652 mg (4.0 mMol) 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (40), fügte 0.25 ccm N-Äthylmorpholin zu und versetzte bei -20° mit einer Lösung von 455 mg (2.2 mMol) DCCI in 2 ccm THF. Man ließ über Nacht im Kühlschrank stehen, hielt noch 1 Std. bei Raumtemperatur und saugte dann vom Dicyclohexylharnstoff ab. Das Filtrat dampfte man i. Vak. ein, löste den Rückstand in Aceton und fügte 0.1 ccm 50 proz. Essigsäure zu. Nach einigen Stunden bei 0° saugte man ab und dampfte die Lösung i. Vak. ein. Die Lösung des Rückstandes in Äthylacetat schüttelte man mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 2 n Citronensäure und Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und dampfte ein. Zur Reinigung löste man in wenig Äthylacetat, gab

die Lösung auf eine Säule 4 x 10 cm aus basischem Aluminiumoxid I, wusch mit 250 ccm Äthylacetat nach und eluierte dann mit Methanol. Das eingedampfte Eluat löste man in Chloroform, trocknete mit Natriumsulfat, filtrierte und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 2.31 g (88 %) des geschützten Decapeptids 45 als schwach gelben, spröden Schaum, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Methanol (92:8). $[\alpha]_D^{20}$: -30.6 ± 0.5° (c = 1.0, Methanol).

$C_{64}H_{96}N_{12}O_{17}$ (1305.5) Ber. C 58.87 H 7.41 N 12.87

Gef.+ C 58.73 H 7.49 N 12.76

+ 15 Stdn. bei 50° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.2	1.0	1.2	0.9	0.8

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (46)

Zu einer Lösung von 3.92 g des geschützten Decapeptids 45 (3.0 mMol) in 5 ccm Aceton gab man 1.65 ccm 2 n NaOH, schüttelte 15 Min. bei 30° und rührte dann noch 45 Min. bei Raumtemperatur. Darauf verdünnte man mit Wasser, säuerte mit 2 n Citronensäure auf pH 3 an und extrahierte mehrfach mit Chloroform. Den Extrakt wusch man mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Der Rückstand wurde in 5 Portionen über eine Säule 2.5 x 84 cm aus Sephadex LH 20 mit Methanol chromatographiert (Uvicord). Man erhielt so 3.05 g (79 %) des amino-

geschützten Decapeptids 46 als farblosen, spröden Schaum, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System n-Propanol/ 25 proz. Ammoniak (7:3). $[\alpha]_D^{20}$: -32.2 ± 0.5° (c = 1.0, Methanol).

$C_{63}H_{94}N_{12}O_{17}$ (1291.5)	Ber.	C 58.59	H 7.34	N 13.02
	Gef.+	C 58.50	H 7.21	N 12.88

+ 19 Stdn. bei 80° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.2	1.0	1.0	0.9	0.9

cyclo-(N^{ε}-Benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (49)

Zu einer Lösung von 2.58 g (2.0 mMol) des aminogeschützten Decapeptids 46 in 20 ccm THF gab man 278 mg (2.0 mMol) p-Nitrophenol und fügte bei 0° eine Lösung von 454 mg (2.2 mMol) DCCI in 2 ccm THF zu. Nach 45 Min. bei 0° ließ man noch 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, saugte vom Dicyclohexylharnstoff ab und dampfte i. Vak. ein. Den Rückstand löste man in Äthylacetat, wusch mit 2 n Citronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2x) und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte ein. Den Rückstand löste man in Chloroform und fällte mit Diäthyläther/n-Hexan (1:1). Da der p-Nitrophenylester-Gehalt des Produkts nur 58 % betrug, wiederholte man die Veresterung mit 125 mg p-Nitrophenol und 200 mg DCCI in gleicher Weise. Das Produkt, dessen p-Nitrophenylester-Gehalt jetzt 82 % war, wurde bei 0° mit 25 ccm eiskalter Trifluoressigsäure

übergossen. Nach 15 Min. ließ man auf Raumtemperatur kommen und nach weiteren 30 Min. dampfte man bei 25° i. Vak. ein. Den öligen Rückstand löste man in einer Mischung aus 0.5 ccm Eisessig und 50 ccm Dimethylformamid und tropfte die Lösung innerhalb 4.5 Stdn. mit einem Dosiertrichter (Fa. Normag) in 1.2 L Pyridin von 60°. Man rührte noch 3 Stdn. bei 60°, dampfte i. Vak. ein, löste den Rückstand in Chloroform und schüttelte mit n HCl, Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und dampfte ein. Die Lösung des Rohprodukts (1.94 g) in Chloroform gab man auf eine Säule 5.5 x 10 cm aus basischem Aluminiumoxid I, wusch mit Chloroform und Äthylacetat und eluierte dann mit Methanol. Den Eindampfrückstand des Eluats löste man in Äthylacetat, gab auf 6 präparative Platten 20 x 40 cm und entwickelte zweimal mit Äthylacetat/Methanol (3:1). Das aus der Hauptzone isolierte Material wurde schließlich noch über Sephadex LH 20 (2.5 x 84 cm, Methanol) gereinigt. Nach Umfällen aus Chloroform/n-Hexan erhielt man 595 mg (25 % bezogen auf 46) des geschützten Cyclodecapeptids 49 als farbloses Pulver vom Schmp. 125-130°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Äthylacetat/Methanol (2:1) und n-Propanol/10 proz. Ammoniak (7:3). $[\alpha]_D^{20}$: -7.0 ± 0.3° (c = 1.0, Methanol).

$C_{58}H_{84}N_{12}O_{14}$ (1173.4) Ber.	C 59.37	H 7.21	N 14.33
Gef.+	C 59.28	H 7.28	N 14.16

+ 12 Stdn. bei 60° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.1	1.1	1.1	1.0	0.8

Die kryoskopische Bestimmung der Molmasse in Dimethylsulfoxid ergab M = 1124 ± 80.

cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (50)

345 mg (0.29 mMol) des geschützten Cyclodecapeptids 49 hydrierte man 7 Stdn. in 50 ccm Methanol und 0.6 ccm n HCl mit 150 mg Palladium/A-Kohle (10 % Pd) und 100 mg Palladium-Mohr, wobei man mehrfach nach Evakuieren mit frischem Wasserstoff auffüllte. Dann wurde der Katalysator abfiltriert, die Lösung i. Vak. eingedampft und der Rückstand i. Vak. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid getrocknet. Zur Reinigung chromatographierte man über Sephadex LH 20 (Säule 2.5 x 84 cm, Methanol) und fällte aus Methanol/Äther um. Man erhielt 152 mg (53 %) 50 als farbloses Pulver, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System n-Propanol/25 proz. Ammoniak (7:3). Das Produkt war Ninhydrin-positiv und wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation. $[\alpha]_D^{20}$: -18.6 ± 0.5° (c = 1.0, Methanol).

$C_{42}H_{74}Cl_2N_{12}O_{10}$ (978.0) Ber. C 51.58 H 7.63 Cl 7.25 N 17.19

Gef.+ C 51.46 H 7.73 Cl 7.98 N 17.10

+ 10 Stdn. bei 75° im Hochvak. getrocknet

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.0	1.1	0.8	0.9	1.1

Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (54a)

Zu 1057 mg (1.5 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (27) gab man 5 ccm 70 proz. wäßr. Trifluoressigsäure und ließ 6 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Dann dampfte man bei 30° i. Vak. ein und trocknete den Rückstand im Ölpumpenvakuum über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid. Nach zweimaligen Umfällen aus Chloroform/Äther erhielt man 882 mg (97 %) 54a als farbloses Pulver, dünnschichtchromatographisch rein im System sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser (93:17:15) und n-Propanol/10 proz. Ammoniak (7:3). Das Produkt war Ninhydrin-positiv und wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm einheitlich als Kation. Die zur Analyse 16 Stdn. bei 65° im Hochvak. getrocknete Substanz enthielt noch 10 % Trifluoressigsäure.

$C_{29}H_{44}N_6O_8$ (604.7)	Ber.	C 57.60	H 7.33	N 13.90	F 0.0
	Gef.+	C 53.87	H 6.89	N 12.72	F 5.0
	Gef.++	C 57.47	H 7.55	N 14.12	

+ 16 Stdn. bei 65° im Hochvak. getrocknet

++ nach Abzug von 10 % Trifluoressigsäure

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	0.9	1.1	0.8	1.0	1.1

Glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolin (54b)

605 mg (1.0 mMol) 54a löste man in 50 ccm Methanol, fügte 1.0 ccm n HCl zu und hydrierte 3 Stdn. mit 100 mg Palladium/A-Kohle

(10 % Pd) und 50 mg Palladium-Mohr. Die vom Katalysator befreite Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand i. Vak. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid getrocknet. Zur Reinigung löste man in Methanol und fällte mit Aceton/n-Hexan (1:1). Man erhielt so 448 mg (88 %) 54b als farbloses Pulver, dünnschichtchromatographisch rein im System n-Propanol/25 proz. Ammoniak (7:3). Die Substanz war Ninhydrin-positiv und wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation. Im Papierchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:1) hat 54b folgende R_F-Werte: 1 mal entwickelt 0.24

2 mal entwickelt 0.36

3 mal entwickelt 0.55

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.0	1.1	0.8	1.1	1.1

Glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (55a)

Zu 800 mg (0.62 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolin (46) gab man 5 ccm 70 proz. wäßr. Trifluoressigsäure und ließ 5 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Die Lösung wurde zunächst im Rotationsverdampfer bei 20° eingeengt und anschließend lyophilisiert. Man erhielt das Produkt in quantitativer Ausbeute als farbloses Pulver, dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) und n-Propanol/

10 proz. Ammoniak (7:3). Die Substanz war Ninhydrin-positiv und wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation.

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.0	1.1	1.1	1.0	0.8

Glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl-L-lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolin (55b)

42 mg (0.035 mMol) 55a löste man in 25 ccm Methanol, fügte 0.12 ccm n HCl zu und hydrierte 4.5 Stdn. mit 40 mg Palladium-Mohr. Die vom Katalysator befreite Lösung dampfte man ein und trocknete den Rückstand i. Vak. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid. Zur Reinigung löste man in Methanol und fällte mit Aceton/n-Hexan (1:1). Man erhielt 30 mg (85 %) 55b als farbloses Pulver. Die Ninhydrin-positive Substanz wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation. Das Produkt war papierchromatographisch rein und hatte im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) folgende R_F-Werte: 1 mal entwickelt 0.14

2 mal entwickelt 0.24

3 mal entwickelt 0.30

Aminosäureanalyse:	Lys	Val	Pro	Gly	Sar
Ber.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef.	1.1	1.1	1.1	1.0	0.8

(N^{α}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysin-methylester (56)

8.62 g (30 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure kochte man 15 Min. mit 20 ccm Thionylchlorid unter Rückfluß, dampfte i. Vak. ein und trocknete i. Vak. über Kaliumhydroxid, wobei das Säurechlorid 30 kristallisierte. Zu einer Lösung von 9.92 g (30 mMol) N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylesterhydrochlorid (20) in 100 ccm Methylenchlorid gab man unter Eiskühlung 10.5 ccm Triäthylamin und tropfte dann unter Kühlen und Rühren die Lösung des Säurechlorids 30 in 40 ccm Methylenchlorid zu. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur schüttelte man mit angesäuertem Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Zur Reinigung löste man in Chloroform und filtrierte über eine Säule 5 x 10 cm aus neutralem Aluminiumoxid IV. Den Inhaltsstoff des Filtrats löste man in Äthylacetat und versetzte in der Hitze mit Cyclohexan. Man erhielt 15.0 g (89 %) 56 als amorphen, schwach gelben Feststoff mit Schmelzbereich 81-88°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Aceton (4:1). $[\alpha]_D^{20}$: -39.5 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol)

$C_{30}H_{33}N_3O_8$ (563.6)	Ber.	C 63.93	H 5.90	N 7.45
	Gef.+	C 63.98	H 6.08	N 7.42

+ 15 Stdn. bei 40° im Hochvak. getrocknet

NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1.3-1.7 ppm (m, 6H); 2.33 (s, 3H); 3.0-3.4 (m, 2H); 3.76 (s, 3H); 4.98 (s, 2H); 5.05 (s, 2H); 7.28-7.47 (m, 12H)

(N^{α}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysin (57)

Zu einer Lösung von 2.82 g (5 mMol) 56 in 20 ccm Methanol gab man 1.4 ccm 4 n NaOH und schüttelte bei Raumtemperatur. Nach 90 Min. verdünnte man mit Wasser und schüttelte mit Chloroform. Zur Trennung der Phasen zentrifugierte man, säuerte die wäßrige Phase mit 4 ccm 2 n HCl an und nahm das Produkt in Chloroform auf. Die Chloroform-Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Äthylacetat/n-Hexan umgefällt, man erhielt 2.15 g (78 %) eines farblosen Pulvers vom Schmp. 135-140°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Benzol/Äthylacetat/Eisessig (30:70:1). $[\alpha]_D^{20}$: -40.6 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol).

$C_{29}H_{31}N_3O_8$ (549.6)	Ber.	C 63.38	H 5.68	N 7.64
	Gef.+	C 63.47	H 5.69	N 7.65

+ 16 Stdn. bei 80° im Hochvak. getrocknet

(N^{α}-2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-(N^{ε}-benzyloxycarbonyl)-L-lysin-methylester (56)

(Kontrolle der spezifischen Drehung): 300 mg 57 wurden in 15 ccm Methanol mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Man verdampfte i. Vak., löste den Rückstand in Äthylacetat und fügte in der Hitze Cyclohexan zu. Amorpher Feststoff mit $[\alpha]_D^{20}$: -38.8 ± 0.5° (c = 2.0, Methanol).

Actinocinyl-bis-N^{α}.$N^{\alpha'}$-L-lysin (58)

1.10 g (2.0 mMol) 57 wurden in 100 ccm Methanol gelöst und mit 100 mg Palladium/A-Kohle (10 % Pd) und 50 mg Palladium-Mohr hydriert. Nach 15 Min. blieb das Volumen konstant, man evakuierte und hydrierte noch 100 Min. mit frischem Wasserstoff, entfernte dann den Katalysator und dampfte die Lösung i. Vak. ein.

Das (N^{α}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin (65b) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:1) eine blau fluoreszierende Zone mit R_F: 0.39.
UV (Methanol): λ_{max} 322 nm

Man löste das (N^{α}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin (65b) in 125 ccm Methanol und leitete unter Lichtausschluß mit einer Fritte Sauerstoff ei. Nach einem Tag begann sich an der Kolbenwandung eine dunkelrote Substanz abzusetzen. Man leitete weiter Sauerstoff ein, wobei man das verdampfte Methanol ersetzte, bis sich die Extinktion der Lösung bei 322 nm nicht mehr änderte, was nach 14 Tagen der Fall war. Dann dekantierte man, spülte mehrfach mit Methanol, trocknete i. Vak. und isolierte von der Kolbenwand und dem Einleitungsrohr 380 mg (65 %) des dunkelroten, mikrokristallinen Produkts. Die Substanz schmilzt nicht bis 320°, ab 220° tritt Schwarzfärbung ein. Papierchromatographisch einheitlich im System n-Butanol/Äthylenglykol/Eisessig/Wasser (20:3:5:5). $[\alpha]_D^{20}$: +54 ± 8° (c = 0.06, n HCl)

$C_{28}H_{36}N_6O_8$ (584.6)	Ber.	C 57.52	H 6.20	N 14.38
	Gef.+	C 57.61	H 6.36	N 14.25

+ 50 Stdn. bei 80° im Hochvak. getrocknet

UV (Wasser): λ_{max} 446 nm (ε = 24 000), 239 (33 300)
Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid (59)

Zu 60 ccm Methanol gab man bei -10° unter Rühren 3.0 ccm (41 mMol) frisch destilliertes Thionylchlorid und fügte dann ebenfalls bei -10° 8.3 g (29.6 mMol) N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Fa. Fluka) zu. Danach erwärmte man langsam auf 40°, hielt 2 Stdn. bei 40°, kühlte wieder auf -10° ab und fügte nochmals 4 ccm Thionylchlorid zu. Nachdem man 2 Stdn. bei 40° gerührt hatte, filtrierte man die Reaktionsmischung durch eine Glasfritte, dampfte das Filtrat i. Vak. ein und trocknete den öligen Rückstand i. Vak. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid. Aus der Lösung des Rohprodukts in Methanol schieden sich nach Zugabe von Äthylacetat farblose Nadeln ab, die man abfiltrierte. Die Mutterlauge wurde eingedampft, der Rückstand in Chloroform gelöst, mit einem Überschuß n-Hexan versetzt und das ausgefallene Öl abgetrennt. Nach mehrmaligen Abdampfen mit Chloroform erstarrte es zu einem spröden, farblosen, stark hygroskopischen Schaum, Ausbeute 7.9 g (81 %). Das Produkt war papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch einheitlich im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) bzw. n-Propanol/25 proz. Ammoniak (7:3). Die Ninhydrin-positive Substanz wanderte im Hochspannungs-Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation. $[\alpha]_D^{20}$: -16.9 ± 0.5° (c = 2.0, Äthanol)

$C_{15}H_{23}ClN_2O_4$ (330.8) Ber. C 54.46 H 7.01 Cl 10.72 N 8.47

Gef.+ C 54.23 H 7.16 Cl 10.66 N 8.45

+ 15 Stdn. bei Raumtemperatur im Hochvak. über Phosphorpentoxid getrocknet.

NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 1.0-2.2 ppm (m, 6H); 2.7-3.2 (m, 2H); 3.65 (s, 3H); 3.94 (breit, 1H); 4.24 (breit, 1H); 5.05 (s, 2H); 7.28 (s, 5H); 7.65-8.35 (breit, 3H)

(N^{α}-Benzyloxycarbonyl)-(N^{ε}-2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin-methylester (60)

Zu einer Lösung des kristallisierten 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorids (30) (aus 3.88 g 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure mit 15 ccm Thionylchlorid erhalten) in 40 ccm Methylenchlorid gab man eine Lösung von 4.47 g (13.5 mMol) N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid (59) in 40 ccm Methylenchlorid und fügte unter Rühren und Kühlen 4 ccm Triäthylamin zu. Nach 15 Stdn. bei Raumtemperatur wusch man mit angesäuertem Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Den Rückstand löste man in Chloroform und filtrierte über eine Säule 5 x 11 cm aus Aluminiumoxid II-III. Den Eindampfrückstand des Filtrats kristallisierte man aus Äthylacetat/Cyclohexan und erhielt 6.55 g (86 %) 60 in farblosen, feinen Nadeln vom Schmp. 114-115°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im System Chloroform/Aceton (4:1).

$[\alpha]_D^{20}$: -7.8 ± 0.2° (c = 2.0, Methanol)

$C_{30}H_{33}N_3O_8$ (563.6) Ber. C 63.93 H 5.90 N 7.45

Gef.+ C 64.03 H 5.80 N 7.48

+ 15 Stdn. bei 60° im Hochvak. getrocknet

NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1.2-2.1 ppm (m, 6H); 2.31 (s, 3H); 3.1-3.55 (m, 2H); 3.7 (s, 3H); 4.1-4.6 (m, 1H); 4.93 (s, 2H); 5.02 (s, 2H); 5.35-5.65 (m, 1H); 6.3-6.65 (m, 1H); 7.2-7.4 (m, 12H)

(N$^{\alpha}$-Benzyloxycarbonyl)-(N$^{\varepsilon}$-2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-L-lysin (61)

1. durch Acylierung von N$^{\alpha}$-Benzyloxycarbonyl-L-lysin:

8.19 g (28.5 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure setzte man mit 30 ccm Thionylchlorid zum Säurechlorid um. Das kristallisierte Säurechlorid löste man in 100 ccm Benzol und 30 ccm Äther, versetzte bei 0° unter Vibromischen mit einer Lösung von 8.0 g (28.5 mMol) N$^{\alpha}$-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Fa. Fluka) in 57 ccm 0.5 n NaOH und tropfte dann noch 28.5 ccm n NaOH zu. Nach 1 Std. Vibromischen säuerte man mit 15 ccm 2 n HCl an, trennte die organische Phase ab und extrahierte noch dreimal mit Äthylacetat. Die vereinigten organischen Phasen wusch man mit Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und dampfte i. Vak. ein. Das Rohprodukt, das noch 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure enthielt, chromatographierte man in 4 Portionen über feines Kieselgel (Säule 4.5 x 40 cm, Benzol/Äthylacetat/Eisessig, 25:75:1). Den Eindampfrückstand der Hauptzone kristallisierte man aus Äthylacetat/Cyclohexan und erhielt 8.9 g (57 %) 61 in schwach gelben, verwachsenen Würfeln vom Schmp. 80-82°, dünnschichtchromatographisch einheitlich im

System Benzol/Äthylacetat/Eisessig (30:70:1). $[\alpha]_D^{20}$: -3.3 ± 0.2° (c = 2.0, Methanol)

$C_{29}H_{31}N_3O_8$ (549.6) Ber. C 63.38 H 5.68 N 7.64
Gef.+ C 63.32 H 5.69 N 7.64

+ 14 Stdn. bei 60° im Hochvak. getrocknet

2. aus (N^{α}-Benzyloxycarbonyl)-(N^{ε}-2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin-methylester (60): Zu einer Lösung von 1127 mg (2.0 mMol) 60 in 10 ccm Methanol gab man 0.55 ccm 4 n NaOH und ließ 90 Min. unter gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemperatur stehen. Man verdünnte mit Wasser und extrahierte mit Chloroform (Phasentrennung durch Zentrifugieren). Die wäßrige Phase säuerte man mit 2 n HCl an, nahm das ausfallende Öl in Chloroform auf und extrahierte noch mehrfach mit Chloroform. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Den Eindampfrückstand kristallisierte man aus Äthylacetat/Cyclohexan und erhielt 679 mg (62 %) 61 als schwach gelbe, verwachsene Würfel vom Schmp. 80-82°. $[\alpha]_D^{20}$: -3.2 ± 0.2° (c = 2.0, Methanol) Die Substanz war chromatographisch einheitlich und identisch mit der nach 1. (S. 86) erhaltenen.

(N^{α}-Benzyloxycarbonyl)-(N^{ε}-2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin-methylester (60)

(Kontrolle der spezifischen Drehung): 300 mg (N^{α}-Benzyloxycarbonyl)-(N^{ε}-2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin (61) wurden mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Man verdampfte i. Vak. und kristallisierte den

Rückstand aus Äthylacetat/Cyclohexan. Farblose Nadeln vom Schmp. 113-114° mit $[\alpha]_D^{20}$: -7.5 ± 0.2° (c = 2.0, Methanol).

Actinocinyl-bis-N^{ε}.$N^{\varepsilon'}$-L-lysin (62)

1.65 g (3.0 mMol) 61 wurden in 200 ccm Methanol mit 300 mg Palladium/A-Kohle (10 % Pd) und 150 mg Palladium-Mohr hydriert. Nach 15 Min. blieb das Volumen konstant, man evakuierte, hydrierte noch 2 Stdn. mit frischem Wasserstoff und entfernte dann den Katalysator.

Das (N^{ε}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysin zeigte im Dünnschichtchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:1) eine blau fluoreszierende Zone mit R_F: 0.35.
UV (Methanol): λ_{max} 323 nm (ε = 3 800)
(Wasser): λ_{max} 312 nm

Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung des (N^{ε}-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-lysins verdünnte man mit Methanol auf 300 ccm, gab 200 ccm Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7.2 zu und versetzte portionsweise unter Rühren mit einer Lösung von 3.10 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 20 ccm Puffer, wobei ein roter, kristalliner Niederschlag ausfiel. Das Produkt wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Man erhielt so 771 mg (88 %) 62 in roten, zu Büscheln verwachsenen Nädelchen, die unterhalb 320° nicht schmelzen (Schwarzfärbung ab 220°). Die Substanz ist papierchromatographisch einheitlich im System n-Butanol/Äthylenglykol/Eisessig/Wasser (20:3:5:5).
$[\alpha]_D^{20}$: +11 ± 8° (c = 0.03, n HCl)

$C_{28}H_{36}N_6O_8$ (584.6) Ber. C 57.52 H 6.20 N 14.38

Gef.+ C 57.38 H 6.25 N 14.36

+ 50 Stdn. bei 80° im Hochvak. getrocknet

UV (Dimethylsulfoxid): λ_{max} 448 nm

Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Plättchendiffusionstest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

Beeinflussung der Wasserlöslichkeit von cyclo-(N^{ε}-Benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (29) durch cyclo-L-Lysyl(N^{ε}-hydrochlorid)-D-valyl-L-prolyl-glycyl-sarkosyl (5)

Zur Bestimmung der Löslichkeit des geschützten Cyclopentapeptids 29 in Wasser rührte man überschüssiges 29 mit 5 ccm bidestilliertem Wasser 5 Tage bei 25°, zentrifugierte und bestimmte die Extinktion der unverdünnten Lösung bei 266.7 nm. Die Konzentration des gelösten Stoffes ergab sich nach folgender Gleichung:

$$c = \frac{E \cdot MM}{\varepsilon \cdot 10} \quad g/100 \text{ ccm}$$

E = Extinktion der Lösung bei dem Absorptionsmaximum der gelösten Substanz

MM = Molmasse der gelösten Substanz

ε = Molarer Extinktionskoeffizient der gelösten Substanz

Für die Löslichkeit des geschützten Cyclopentapeptids 29 in Wasser bei 25° ergab sich:

$$c = \frac{0.302 \cdot 586.7}{117 \cdot 10} = 287 \text{ mg/100 ccm}$$

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Löslichkeit des geschützten Cyclopentapeptids 29 in Wasser durch das gut wasserlösliche Hydrochlorid 5 der Cyclopentapeptid-Base rührte man überschüssiges 29 mit 125 mg 5 in 5 ccm bidestilliertem Wasser bei 25°. Nach 5 Tagen zentrifugierte man, verdünnte mit bidestilliertem Wasser auf das 2.5fache und bestimmte die optische Dichte bei 267 nm. Da das Cyclopentapeptid-hydrochlorid 5 bei 267 nm in Wasser ebenfalls absorbiert (Flanke der Amid-Bande), muß von dem gefundenen Wert 0.57 die Extinktion 0.29, die eine Lösung gleicher Konzentration (50 mg/5 ccm) von 5 in Wasser aufweist, abgezogen werden. Aus der Extinktion

$$E = (0.57 - 0.29) \cdot 2.5 = 0.70$$

ergibt sich mit dem Extinktionskoeffizienten für 267 nm die Löslichkeit zu

$$c = \frac{0.70 \cdot 586.7}{116.5 \cdot 10} = 352 \text{ mg/100 ccm.}$$

Die Löslichkeit des geschützten Cyclopentapeptids 29 in Wasser bei 25° wird also durch die Zugabe von 2.5 g/100 ccm des Cyclopentapeptid-hydrochlorids 5 um 23 ± 8 % erhöht.

Ich danke Fräulein E.Pietsch und Herrn U.Leonhardt für die Messung der NMR-Spektren, den Herren Dr. O.Pfundt und M.Beller für die Durchführung der Mikroanalysen, Herrn W.Sinn für die Ausführung der Aminosäurebestimmungen sowie Frau E.v.Trotha und Frau M.Lackner für die mikrobiologischen Tests.

Für wissenschaftlichen Unterricht danke ich meinen akademischen Lehrern, den Herren
Prof. Dr. W.Bingel, Prof. Dr. Dr. e.h. H.Brockmann,
Prof. Dr. W.-D.Erdmann, Prof. Dr. A.Flammersfeld,
Prof. Dr. K.Friedberg, Prof. Dr. G.Gattow,
Prof. Dr. O.Glemser, Prof. Dr. A.Hasselblatt,
Prof. Dr. R.Hilsch, Prof. Dr. W.Jost,
Prof. Dr. W.Lüttke, Prof. Dr. G.Schmidt,
Prof. Dr. U.Schöllkopf, Prof. Dr. G.Spiteller,
Prof. Dr. H.Strehlow, Prof. Dr. H.G.Wagner,
Prof. Dr. H.Winkler, Prof. Dr. J.Zemann und
Prof. Dr. M.Ziegler.

X. Literaturverzeichnis

1) S.A.Waksman u. H.B.Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 (1940)

2) Chr.Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 (1952)
60, 250 (1954)
Strahlentherapie 90, 296 (1953)
Med. Klin. 49, 1539 (1954)

3) G.Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 (1952)
Strahlentherapie 94, 491 (1954)

4) C.T.C.Tan, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 5, 63 (1964)

5) Chr.Hackmann, Chemotherapie 1, 341 (1960)

6) H.Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 18, 1 (1960)

7) B.Hsu et al., Scientia sinica 13, 789 (1964)

8) G.Schmidt-Kastner, Naturwissenschaften 43, 131 (1956)

9) H.Brockmann u. B.Franck, Chem. Ber. 87, 1767 (1954)

10) H.Brockmann, H.Gröne u. G.Pampus, Chem. Ber. 91, 1916 (1958)

11) D.Berndt, Dissertat. Univ. Göttingen (1961)

12) H.Brockmann, W.Müller u. H.Peterssen-Borstel, Tetrahedron Letters 3531 (1966)

13) H.Brockmann, J.Ammann u. W.Müller, Tetrahedron Letters 3595 (1966)

14) H.Brockmann, P.Hocks u. W.Müller, Chem. Ber. 100, 1051 (1967)

15) F.Seela, Dissertat. Univ. Göttingen (1967)

16) H.Brockmann u. F.Seela, Chem. Ber. 104, 2751 (1971)

17) E.Schulze, Dissertat. Univ. Göttingen (1970)

18) H.Brockmann u. E.Schulze, Tetrahedron Letters 1489 (1971)

19) F.Seela, J. Med. Chem. 15, 684 (1972)

20) A.B.Mauger u. R.Wade, J. Chem. Soc. Ser. C 1406 (1966)

21) H.Brockmann u. W.Schramm, Tetrahedron Letters 2331 (1966)

22) W.Schramm, Dissertat. Univ. Göttingen (1967)

23) H.Brockmann u. H.Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968)

24) J.Meienhofer u. R.P.Patel, Int. J. Protein Res. 3, 347 (1971)

25) E.Atherton u. J.Meienhofer, J. Amer. Chem. Soc. 94, 4759 (1972)

26) C.W.Mosher u. L.Goodman, J. Org. Chem. 37, 2928 (1972)

27) H.Brockmann u. H.Lackner, Naturwissenschaften 47, 230 (1960) 51, 384 (1964); 48, 555 (1961)

28) H.Brockmann u. H.Lackner, Chem. Ber. 100, 353 (1967)

29) H.Brockmann u. H.Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968)

30) W.Kersten, H.Kersten u. H.M.Rauen, Nature 187, 60 (1960)

31) W.Müller, Habilitationsschrift Univ. Göttingen (1967)

32) W.Müller u. D.M.Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251 (1968)

33) D.T.Warner, Nature 190, 120 (1961)

34) E.Schröder u. K.Lübke, The Peptides Vol. I u. II, Academic Press (New York 1965,1966)

35) V.Graef, Dissertat. Univ. Göttingen (1962)

36) H.Brockmann u. V.Graef, Naturwissenschaften 49, 540 (1962)

37) K.Kuromizu u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 2199 (1970)

38) K.Kuromizu u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 2944 (1970)

39) N.Mitsuyasu, S.Matsuura, M.Waki, M.Ohno, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1829 (1970)

40) R.O.Studer u. W.Lergier, Helv. Chim. Acta 48, 460 (1965)

41) S.K.Majumdar u. S.K.Bose, Biochem. J. 74, 596 (1960)

42) E.P.Abraham, Biochemistry of Some Peptide and Steroid Antibiotics, Wiley (New York 1957)

43) Q.R.Bartz, J.Ehrlich, J.D.Mold, M.A.Penner u. R.M.Smith, Amer. Rev. Tuberc. 63, 4 (1951)

44) T.Kitagawa, T.Miura, K.Fujiwara u. H.Taniyama, Chem. Pharm. Bull. 20, 2215 (1972)

45) G.F.Gause u. M.G.Brazhnikova, Lancet II 715 (1944)

46) R.L.M.Synge, Biochem. J. 39, 363 (1945)

47) F.Sanger, Biochem. J. 40, 261 (1946)

48) R.Consden, A.H.Gordon, A.J.P.Martin u. R.L.M.Synge, Biochem. J. 41, 596 (1947)

49) A.R.Battersby u. L.C.Craig, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1887 (1951)

50) R.Schwyzer u. P.Sieber, Chimia 10, 265 (1956)

51) R.Schwyzer u. P.Sieber, Helv. Chim. Acta 40, 624 (1957)

52) R.Schwyzer u. P.Sieber, Angew. Chem. 68, 518 (1956)

53) R.Schwyzer u. P.Sieber, Helv. Chim. Acta 41, 2186 (1958)

54) R.Schwyzer u. P.Sieber, Helv. Chim. Acta 43, 1910 (1960)

55) R.Schwyzer, Ciba AG Basel, D.A.S. 1, 112, 525 (1959)

56) J.Halstrom u. H.Klostermeyer, Liebigs Ann. Chem. 715, 208 (1968)

57) H.Aoyagi, T.Kato, M.Ohno, M.Kondo u. N.Izumiya, J. Amer. Chem. Soc. 86, 5700 (1964)

58) H.Aoyagi, T.Kato, M.Ohno, M.Kondo, M.Waki, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 38, 2139 (1965)

59) H.Aoyagi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 39, 1747 (1966)

60) M.Kondo, H.Aoyagi, T.Kato u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 39, 2234 (1966)

61) M.Waki u. N.Izumiya, J. Amer. Chem. Soc. 89, 1278 (1967)

62) R.Nagata, M.Waki, M.Kondo, H.Aoyagi, T.Kato, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 963 (1967)

63) M.Kondo u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 1975 (1967)

64) M.Waki, O.Abe, R.Okawa, T.Kato, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2904 (1967)

65) M.Waki u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 41, 1909 (1968)

66) H.Aoyagi, T.Kato, M.Waki, O.Abe, R.Okawa, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 42, 782 (1969)

67) S.Matsuura, M.Waki, S.Makisumi u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1197 (1970)

68) O.Abe u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1202 (1970)

69) M.Kondo u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1850 (1970)

70) S.Lee, R.Ohkawa u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 44, 158 (1971)

71) S.Matsuura, M.Waki u. N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Japan 45, 863 (1972)

72) M.Iwai, K.Nakajima, A.Uno, S.Hase, I.Takeuchi u. K.Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan 43, 3246 (1970)

73) J.Meienhofer, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3771 (1970)

74) W.Opitz, Dissertat. Univ. Göttingen (1973)

75) R.Schwyzer, Chimia 12, 53 (1958)

76) D.C.Hodgkin u. B.M.Oughton, Biochem. J. 65, 752 (1957)

77) R.Schwyzer u. U.Ludescher, Biochemistry 7, 2519 (1968)

78) R.Schwyzer u. U.Ludescher, Helv. Chim. Acta 52, 2033 (1969)

79) C.H.Hassall u. W.A.Thomas, Chem. Brit. 7, 145 (1971)

80) K.D.Kopple, J. Pharm. Sci. 61, 1345 (1972)

81) H.Kappeler u. R.Schwyzer, Helv. Chim. Acta 43, 1453 (1960)

82) J.C.Sheehan u. G.P.Hess, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)

83) H.Zahn u. H.Schüssler, Liebigs Ann. Chem. 641, 176 (1961)

84) H.Schüssler u. H.Zahn, Chem. Ber. 95, 1076 (1962)

85) W.Siefken, Liebigs Ann. Chem. 562, 75 (1949)

86) G.I.Tesser u. R.J.F.Nivard, Rec. Trav. Chim. 83, 53 (1964)

87) M.Brenner u. W.Huber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953)

88) R.A.Boissonnas, S.Guttmann, R.L.Huguenin, P.-A.Jaquenoud u. E.Sandrin, Helv. Chim. Acta 41, 1867 (1958)

89) R.Schwyzer u. B.Gorup, Helv. Chim. Acta 41, 2199 (1958)

90) W.König u. R.Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)

91) W.König u. R.Geiger, Chem. Ber. 103, 2034 (1970)

92) R.Geiger, Angew. Chem. 83, 155 (1971)

93) D.Harrison u. A.C.B.Smith, J. Chem. Soc. 1960, 2157

94) G.Losse, D.Zeidler u. Th.Grieshaber, Liebigs Ann. Chem. 715, 196 (1968)

95) E.Schnabel, H.Klostermeyer u. H.Berndt, Liebigs Ann. Chem. 749, 90 (1971)

96) U.Ludescher u. R.Schwyzer, Helv. Chim. Acta 55, 2052 (1972)

97) E.F.Gale, E.Cundliffe, P.E.Reynolds, M.H.Richmond u. M.J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, Wiley (London 1972)

98) V.Prelog u. H.Gerlach, Helv. Chim. Acta 47, 2288 (1964)

99) M.M.Shemyakin, Y.A.Ovchinnikov, V.T.Ivanov u. I.D.Ryabova, Experientia 23, 326 (1967)

100) I.M.Hais u. K.Macek, Handbuch der Papierchromatographie Band I, Fischer (Jena 1958)

101) F.Reindel u. W.Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)

102) G.Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, de Gruyter (Berlin 1966)

103) M.S.Dunn, F.J.Ross u. L.S.Read, J. Biol. Chem. 103, 579 (1933)

104) T.L.McMeekin, E.J.Cohn u. J.H.Weare, J. Amer. Chem. Soc. 58, 2173 (1936)

105) A.Neuberger u. F.Sanger, Biochem. J. 37, 515 (1943)

106) K.Schlögl u. H.Fabitschowitz, Monatsh. Chem. 84, 937 (1953)

107) G.Fölsch u. K.Serck-Hanssen, Acta Chem. Scand. 13, 1243 (1959)

Lebenslauf

Am 23. Dezember 1940 wurde ich, Götz Schwoerer, als sechstes Kind des Arztes Dr. Max Schwoerer und seiner Ehefrau Dr. Hildegard Schwoerer, geb. Buddee, in Göttingen geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Holzminden, legte 1951 die Aufnahmeprüfung zum Gymnasium für Jungen in Holzminden ab und erwarb dort im Februar 1960 das Zeugnis der Reife.

Nach Ableistung des Wehrdienstes von April 1960 bis Dezember 1961 begann ich im Sommersemester 1962 an der Georg-August-Universität in Göttingen das Studium der Chemie und bestand nach Abschluß der Grundpraktika am 8.11.1965 das Diplom-Vorexamen. Nach Beendigung eines Zusatzpraktikums für Organiker arbeitete ich unter Leitung von Professor Dr. Dr. e.h. H. Brockmann von April 1966 bis Oktober 1967 an meiner Diplomarbeit mit dem Thema: "Versuche zur Isolierung von N-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl-peptiden als Actinomycin-Vorstufen aus Streptomyceten-Kulturen" und legte am 14.2.1968 das Diplom-Hauptexamen ab.

Seitdem arbeite ich ebenfalls unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. e.h. H. Brockmann an der vorliegenden Dissertation.